

A potroh és az ivarsejtek kialakításában szerepet játszó gének azonosítása *Drosophila melanogaster*ben

Ph.D. értekezés

Szegedi Tudományegyetem
MTA Szegedi Biológia Központ, Genetika Intézet

Készítette: Jankovics Ferenc
Témavezető: Dr. Erdélyi Miklós

2002

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Erdélyi Miklósnak, aki lehetővé tette, hogy csoportjában éveken át kiegyensúlyozott munkát végezhessek. Hálás vagyok tanácsaiért és azért, hogy követendő példát nyújtott emberségével és tudományos tevékenységével. Köszönettel tartozom még segítőkészségükért munkatársaimnak, Sinka Ritának, Szuperák Milánnak, és asszisztensünknek Ugrainé Szatmári Margitnak. Köszönöm a szegedi *Drosophila* közösség tagjainak minden segítségüket, és hogy munkámhoz ösztönző tudományos légkört teremtettek.

TARTALOMJEGYZÉK

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	2
---------------------------	---

TARTALOMJEGYZÉK	3
-----------------------	---

BEVEZETÉS	5
-----------------	---

Általános bevezetés és célkitűzés	5
---	---

Irodalmi áttekintés	12
---------------------------	----

A petesejt érésének rövid összefoglalása	12
Anyagszállítás a dajkasejtekből a petesejtbe	13
Az <i>osk</i> mRNS szállítása a petesejt poszterior pólusára	16
Az <i>osk</i> mRNS és az OSK fehérje rögzülése a poszterior póluson	18
A poláris plazma kialakulása	20

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	22
----------------------------	----

Drosophila törzsek	22
A mutáns fenotípusok vizsgálata	22
Genetikai interakción alapuló mutánsizolálás	23
Géncsapda elven alapuló P-elemes mutagenézis	24
Az EMS mutagenézis hatékonyságának vizsgálata	27
Az <i>E(To)</i> mutánsok vizsgálata a <i>TmII^{eg9}</i> / <i>TmII^{eg20}</i> érzékenyített rendszerben	27
Komplementációs analízis	27
Az <i>E(To)</i> mutációk térképezése	28
Ivarsejtklónok analízise	28
mRNS <i>in situ</i> hibridizáció	29
Immunfestések	30
Kinesin:β-Galaktozidáz és Nod:β-Galaktozidáz festés	31
Tau:GFP és Tubulin:GFP vizsgálata élő petefészekben	32
Genomikus DNS izolálása	32
Inverz PCR	32
Reverz transzkripció és PCR	33
Western analízis	34

EREDMÉNYEK	35
------------------	----

Genetikai interakción alapuló mutánsizolálás és a <i>Rab11</i> gén jellemzése	35
---	----

Érzékenyített mutáns háttér kialakítása	35
Az <i>E(To)</i> mutációk izolálása	36
Az <i>E(To)</i> mutációk komplementációs analízise	40
Az <i>E(To)</i> mutációk térképezése	41
Homozigóta <i>E(To)</i> fenotípusok	43
Az <i>E(To)3</i> és az <i>E(To)11</i> mutációk a <i>Rab11</i> gén alléljai	44
A <i>Rab11</i> gén szükséges az <i>osk</i> mRNS lokalizációjához	47
A <i>Rab11</i> hatása az <i>osk</i> mRNS lokalizációjára ivarsejtfüggő	48

A <i>Rab11</i> szükséges a petesejt sejtváának működéséhez	50
Géncsapda elven alapuló P- elemes mutánsizolálás	53
Géncsapda elven alapuló P-elemes mutánsizolálás.....	53
A <i>GT193</i> mutáció a <i>Dmoe</i> gén allélja	54
A <i>GT193</i> allél komplementációs analízise	55
A DMOE kifejeződési mintázata	60
A <i>Dmoe</i> mutációja az ivarsejtekben aktinhibákat okoz	61
A <i>Dmoe</i> mutációja a bordersejtek vándorlásának késését okozza	64
A <i>Dmoe</i> mutációja hibás <i>osk</i> mRNS és fehérje lokalizációt okoz	65
A <i>Dmoe</i> hatása a petekamrában ivarsejtvonal-függő	70
A <i>Dmoe</i> a mikrotubulusoktól függetlenül hat az <i>osk</i> lokalizációra.....	71
AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA.....	77
AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA.....	79
Genetikai interakción alapuló mutánsizolálás.....	79
Az érzékenyített háttér domináns enhanszereinek izolálása	79
A <i>Rab11</i> szerepe az <i>osk</i> mRNS lokalizációban	80
Géncsapda elven alapuló P- elemes mutánsizolálás	82
Géncsapda-inszerciók izolálása.....	82
A <i>Dmoe</i> részt vesz az aktin-sejthártya keresztkötésében	85
A <i>Dmoe</i> és az <i>osk</i> lokalizáció.....	87
A <i>Dmoe</i> és a bordersejtek vándorlása	90
A <i>Dmoe</i> és a gyűrűcsatornák	92
A <i>Moesin</i> és a <i>Rab11</i> lehetséges kapcsolata.....	93
SUMMARY	95
Interaction type of genetic screen	95
Loss-of function screen with „gene trap” P-element.....	97
FÜGGELÉK.....	HIBA! A KÖNYVJELZŐ NEM LÉTEZIK.
Az interakciós mutagenézis menete	Hiba! A könyvjelző nem létezik.
A géncsapda mutagenézis menete	Hiba! A könyvjelző nem létezik.
IRODALOMJEGYZÉK	101
SAJÁT KÖZLEMÉNYEK.....	113

BEVEZETÉS

Általános bevezetés és célkitűzés

A génműködés poszttranszkripciós szabályozásának egyik fontos szintjét képviseli a szubcelluláris mRNS lokalizáció, ami rendkívül hatásos módja a génaktivitás korlátozásának a sejt egy adott régiójába. A génaktivitás mRNS lokalizálással történő irányítása egy sejtrészbe az egész élővilágban általánosan elterjedt jelenség, hiszen az egysejtű élesztőben és a fejlett növényi és állati szövetek legkülönbözőbb sejtjeiben egyaránt előfordul (BASHIRULLAH és mtsai. 1998; CHARTRAND és mtsai. 2001; JANSEN 2001; KLOC és mtsai. 2001; LIPSHITZ és SMIBERT 2000; PALACIOS és JOHNSTON 2001; SEYDOUX és SCHEDL 2001). Az mRNS-ek szubcelluláris lokalizálása számos előnnyel jár a sejt szempontjából, hiszen a lokalizált mRNS transzlálása gazdaságosan biztosíthat magas fehérjekoncentrációt egy adott sejtrészben. Vándorló gerinces fibroblaszt sejtek vezető lamelláiban például *β -aktin* mRNS halmozódik fel, melyről a felhasználási hely közvetlen közelében képződhet a sejt mozgásához szükséges nagy mennyiségű β -aktin fehérje (LAWRENCE és SINGER 1986). Számos mRNS lokalizálódik az emlős idegsejtek nyúlványaiban is, és helyhez kötött transzlációjuk a szinapszisokban hozza létre a kódolt fehérjemagas koncentrációját (KIEBLER és DESGROSEILLERS 2000; LIPSHITZ és SMIBERT 2000; PALACIOS és JOHNSTON 2001; ROEGIERS és JAN 2000). Más esetben az mRNS lokalizációja morfogén fehérjegrádiens kialakulását teszi lehetővé. Ennek szép példája a *Drosophila* petéjének anterior pólusán lokalizált *bicoid* (*bcd*) mRNS, melyről a transzláció után anterior-poszterior irányban csökkenő BCD fehérjegrádiens alakul ki (BERLETH és mtsai. 1988). Az mRNS-ek lokalizálása szerepet játszik továbbá a sejtvonalak leszármazásának szabályozásában is, ahol az aszimmetrikus sejtosztódás után az utódsejtek

egyikébe elkülönített speciális mRNS-ek határozzák meg az utódsejt identitását. Ez történik például a férgek, rovarok, kételtűek ivarsejtvonalának elkülönülésekor, vagy az élesztősejtek párosodási típusának meghatározásakor (EPHRUSSI és LEHMANN 1992; LONG és mtsai. 1997; SEYDOUX és FIRE 1994; ZHOU és KING 1996). A sejtosztódás után az utódsejtek egyikébe történő mRNS lokalizálás a neuroblasztok differenciálódásában is nélkülözhetetlen (LI és mtsai. 1997). Az mRNS lokalizálásnak fontos szerepe van végül specifikus mRNS-ek bizonyos sejtalkotókhoz vagy szubcelluláris struktúrákhoz történő elkülönítésében. Szemléletes példája ennek a jelenségnek a *cyclinB* mRNS mitotikus orsóhoz történő lokalizálása (GROISMAN és mtsai. 2000).

Az utóbbi évtizedben a lokalizált mRNS-ek felfedezése után a figyelem azoknak a folyamatoknak a feltárására összpontosult, amelyek az mRNS-ek lokalizációját irányítják. Bebizonyosodott, hogy az mRNS-ek szállítását a felhasználási helyükre a sejtváz- rendszer végzi, amiből nyilvánvalóvá vált, hogy a mRNS-ek lokalizációja rendkívül bonyolult szabályozás alatt áll. Mivel az élő sejtben a különböző sejtalkotók és biológiai folyamatok összetett kölcsönhatásban állnak egymással, a sejtváz befolyásolásával számos egyéb folyamat hat közvetetten az mRNS-ek lokalizálására. Ilyen folyamat többek között a különböző szignáltranszdukciós utak működése, vagy a lokalizált mRNS-ek transzlációját szabályozó összetett represszor, derepresszor és aktivátor rendszer jelenléte. A különböző sejtekben megvalósuló mRNS lokalizáció vizsgálatával ezért a speciális fejlődésbiológiai események feltárásán túl, alapvető sejtbiológiai jelenségek megismerésére is lehetőség nyílik.

Az mRNS lokalizáció vizsgálatára legalkalmasabb és leggyakrabban használt rendszer a *Drosophila melanogaster* (ecetmuslica) petesejtje és korai embriója. Ez egyrészt annak köszönhető, hogy az ecetmuslicáról rendelkezésünkre álló genetikai, fejlődésbiológiai és biokémiai ismeretek rendkívül bőségesek, hiszen a *Drosophila* az ezirányú kutatásoknak már egy évszázada kedvelt modellorganizmusa. Ennek következménye, hogy számos hatékony

eszköz és módszer van a birtokunkban, melyekkel az mRNS lokalizáció folyamata megismerhető. Másrészt, a *Drosophila* petesejtjét és embrióját viszonylag nagy mérete és könnyű kezelhetősége is különösen alkalmassá teszi az mRNS lokalizáció vizsgálatára. Mindeztől kezdve a legrészletesebben a *Drosophila* petesejtjét tanulmányozták, és ebben az egyetlen sejtben, több mint tíz mRNS-ről mutatták ki, hogy a sejt egy kitüntetett citoplazmarészében lokalizálódik.

A *Drosophila* zigótájának létrehozásához a hím és a női ivarsejtek nem egyforma mértékben járulnak hozzá. A petesejt citoplazmája örökíti azokat a tápanyagokat és információs faktorokat is, amelyek nélkülözhetetlenek az embrió normális korai egyedfejlődéséhez. Ezt a jelenséget anyai hatásnak nevezzük. A *Drosophila* embrióban vannak olyan anyai öröklődésű faktorok is, melyeknek nemcsak a megléte, hanem a petében elfoglalt helye is fontos. Ezek a citoplazmában lokalizált aszimmetrikus elhelyezkedésű morfogén molekulák határozzák meg az anterior- poszterior és a dorzális- ventrális testtengelyek pozícióját, és szabályozzák az ivarsejt-testisejt elkülönülést. A morfogén fehérjék embrióban belüli helyhez kötött működése azonban nemcsak a fehérjemolekulák odaszállításával, hanem a fehérjéket kódoló mRNS-ek lokalizációjával és helyspecifikus transzlációjával is megvalósulhat. Mivel a zigóta citoplazmája lényegében a petesejttől származik, az embrió polaritását a petesejt aszimmetriája határozza meg. A peteérés során a petesejtben aszimmetrikusan elhelyezkedő morfogén mRNS-ek szabják meg az embrió anterior-poszterior és dorzális-ventrális testtengelyeinek pozícióját és szabályozzák az ivarsejt-testisejt elkülönülést.

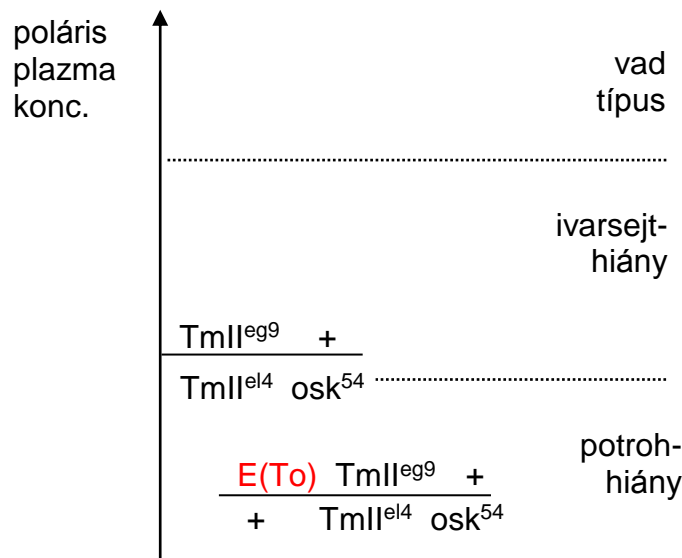
Az általunk tanulmányozott morfogén, az *oskar* (*osk*) mRNS és OSK fehérje a petesejt poszterior pólusán lokalizálódik, és ott egy rendkívül speciális citoplazmarészt, a poláris plazmát alakít ki (EPHRUSSI és mtsai. 1991; KIM-HA és mtsai. 1991). A poláris plazmában vannak jelen azok az mRNS-ek és fehérjék, melyek a megtermékenyítés után az embrió

poszterior pólusán a potroh és az ivarsejtek kialakítását irányítják. A poláris plazma hiányában potroh és ivarsejthiányos embriók fejlődnek. Munkánk célja olyan gének azonosítása volt, melyek a poláris plazma kialakulását és működését szabályozzák, és ezáltal a *Drosophila* potrohának és ivarsejtjeinek kialakításában játszanak szerepet. Mivel ennek a folyamatnak központi lépése az *osk* mRNS lokalizációja a petesejt poszterior pólusára, így a potroh és az ivarsejtek kialakulását befolyásoló gének azonosításával lehetőségünk nyílik az mRNS lokalizációt irányító tényezők megismerésére. Mivel az mRNS lokalizáció nem kizárólag a *Drosophila* sajátossága, hanem az egész élővilágban elterjedt biológiai jelenség, az *osk* mRNS lokalizációjára ható gének tanulmányozásával általános érvényű ismereteket nyerhetünk az mRNS lokalizáció szabályozását illetően.

A *Drosophila* potrohának és ivarsejtjeinek kialakulását befolyásoló gének (poszterior csoport génjei) azonosítását megnehezíti az a tény, hogy mutásaik fenotípusának közvetlen vizsgálata csak homozigóta életképes allélekkel végezhető el. A poszterior pólus kialakításában azonban bizonyítottan olyan pleitrop hatású gének is szerepet játszanak, melyek mutációi általában letálisak. Olyan vizsgálati módszerek kidolgozására van tehát szükség, melyekkel akár a letális mutációknak is feltárható a potroh- és ivarsejtek kialakításában betöltött szerepe. Egy ilyen eljárás például a homozigóta ivarsejtklónok vizsgálata (CHOU és PERRIMON 1996). Ez a módszer lehetővé teszi letális mutációk ivarsejtspecifikus hatásának vizsgálatát. A vizsgálni kívánt letális mutációra nézve a felnőtt állat heterozigóta, így túlél, az ivarsejtvonalban azonban homozigóta mutáns mozaik klónok vannak. Ennek a módszernek a hiányossága azonban, hogy nem teszi lehetővé azoknak a géneknek a vizsgálatát, melyek a poszterior pólus kialakításán kívül a korai petesejteréshez is szükségesek, mivel az ilyen gének mutációinak korai fenotípusai elfedik a poszterior pólus kialakulásában megjelenő hibákat (PERRIMON és mtsai. 1996). A pleitrop effektus okozta akadályokat elhárítandó mi két, különböző elven működő mutánsizolálási kísérletet hajtottunk

vége, melyekkel számos új, pleiotróp hatású poszterior gént azonosítottunk. Doktori dolgozatom a genetikai interakción alapuló mutagenézissel izolált *Rab11* és a transzpozonos mutagenézissel azonosított *Drosophila moesin* (*Dmoesin*) géneknek a potroh és az ivarsejtek kialakításában betöltött szerepét írja le.

TropomyosinII (*TmII*) és *osk* gének alléljainak felhasználásával létrehoztunk egy domináns genetikai interakción alapuló mutánsizolálási rendszert, amit sikeresen alkalmaztunk a potroh és az ivarsejtek kialakulását befolyásoló gének azonosítására. Az autoszómákon újonnan létrehozott EMS-indukált mutációk között olyan mutációkat kerestünk, melyek dominánsan megemelik az érzékenyített genetikai háttér okozta fenotípus penetranciáját (1. ábra). A domináns genetikai interakción alapuló mutánsizolálási módszer lényege, hogy az érzékenyített háttér annyira felerősíti a heterozigóta mutációknak a poláris plazmára kifejtett hatását, hogy az egészen kis hatásokat is ki tudjuk mutatni. A kísérlet során a vizsgált letális mutációra nézve az egyed heterozigóta, így túlél, lehetővé téve a potroh és az ivarsejtek kialakításában részt vevő pleiotróp gének letális alléljainak azonosítását is. Kísérletünkben sikerült már ismert, a potroh és az ivarsejtek kialakulását befolyásoló gének új alléljait azonosítani, ami módszerünk használhatóságát bizonyítja. A már ismerteken kívül sikerült a a potroh és az ivarsejtek kialakulását befolyásoló gének csoportját (poszterior csoport) további génekkel kibővíteni. Ebben a dolgozatban a genetikai interakción alapuló mutánsizolálás végrehajtásáról, és egy új poszterior génnek, a *Drosophila Rab11*-nek a részletes vizsgálatáról számolunk be. Bemutatjuk, hogy a *Rab11* mutáns petesejtekben az *osk* mRNS hibásan lokalizálódik, míg más morfogén molekulák lokalizációja illetve a petesejt és a follikuláris sejtek közötti kommunikáció ép marad. Kimutatjuk, hogy a *Rab11* a polarizált mikrotubulusváz helyes működéséhez szükséges. Bizonyítjuk, hogy a *Rab11* az *osk* mRNS szállításában játszott szerepén keresztül hat a poláris plazma kialakulására.



1. ábra A genetikai interakción alapuló mutánsizolálási kísérlet elve. A *TmII* és *osk* génekből kialakított érzékenyített háttéren indukált domináns enhanszer mutáció csökkenti a poláris plazma koncentrációját, így megemelik az érzékenyített genetikai háttér okozta fenotípus penetranciáját. Ezeket a domináns enhanszer mutációkat *Enhancer of TmII and osk (E(To))* mutációknak neveztünk el.

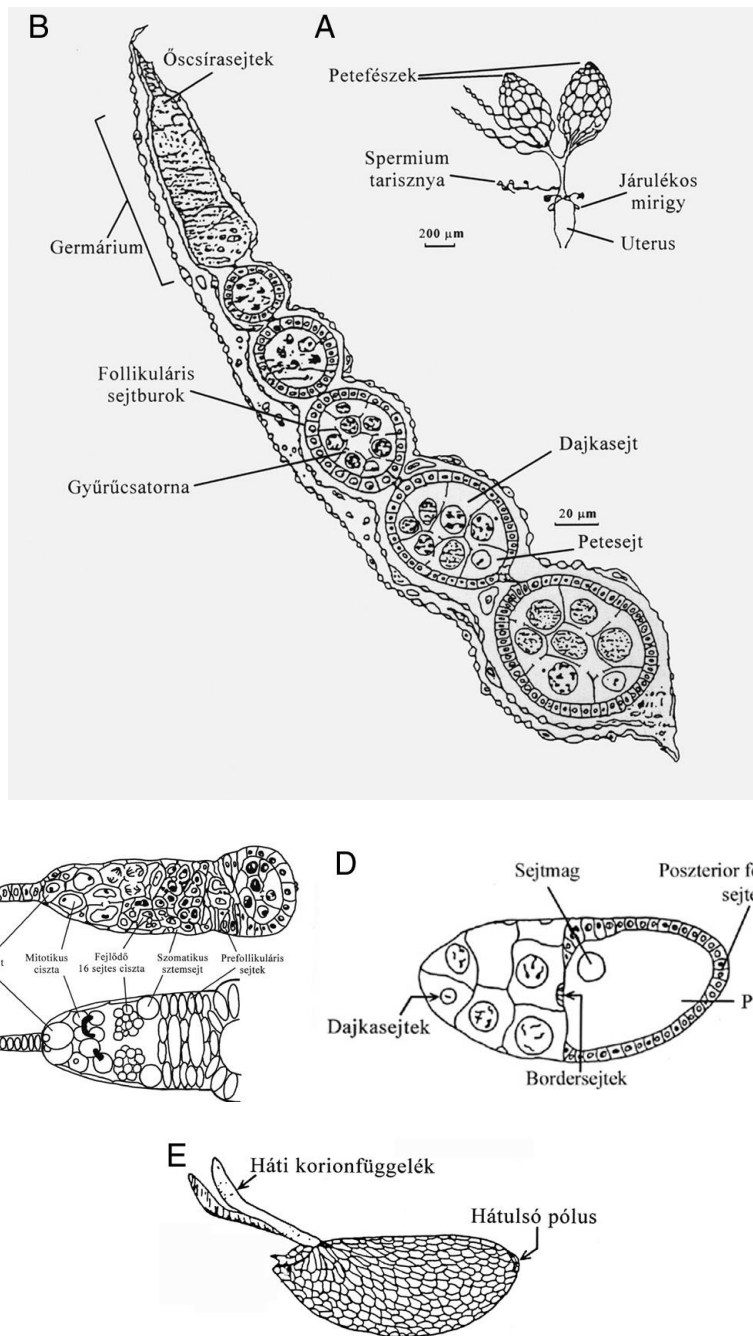
A poszterior csoport génjeinek pleitrop hatását kiküszöbölhetjük gyenge mutáns alléljaik létrehozásával is. Mivel a P-elem előszeretettel épül be a gének 5' szabályozó régiójába, gyakran okoz gyenge mutáns fenotípusú mutációkat. A poszterior csoportba tartozó gének azonosítását célzó transzpozonos mutagenéziseket eddig csak az autoszómákon hajtottak végre, az X-kromoszómán alig ismert poszterior csoportba tartozó gén. Géncsapda elven működő P-elemmel (LUKACSOVICH és mtsai. 2001) ezért az X-kromoszómán hajtottunk végre mutagenézist, mellyel ivarsejthiányos fenotípusa alapján a *Dmoesin (Dmoe)* gén egy allélját izoláltuk. Ebben a dolgozatban bemutatjuk, hogy a *Dmoe* mutánsok ivarsejthiányos fenotípusának oka a helytelen *osk* mRNS és OSK fehérje lokalizáció. Bizonyítjuk, hogy a *Dmoe* a mikrotubulusváztól és a petesejt-follikuláris sejt kommunikációtól függetlenül hat az *osk* lokalizációjára. Feltárjuk továbbá, hogy a *Dmoe* az

aktinváz-sejthártya kapcsolat befolyásolásával, az OSK fehérjének a poszterior póluson történő rögzítésén keresztül hat az ivarsejtek kialakítására.

Irodalmi áttekintés

A petesejt érésének rövid összefoglalása

A *Drosophila* petéi a két petefészekben alakulnak ki (2A ábra). Mindkét petefészek egyenként 16-18 petecsőből áll, melyekben a petesejtek az ivarsejtekből és a szomatikus follikuláris sejtekből álló petekamrában fejlődnek (2B ábra) (összefoglalva ld. (SPRADLING 1993). Minden petecsőben két régiót különböztetünk meg: a germáriumot és a vitelláriumot. A petekamra a petefészek anterior csúcsán lévő germáriumban alakul ki, ahol az ivarsejtek és a follikuláris sejtek őssejtjei találhatók (2C ábra). A germáriumban az ivarsejtek őssejtjei aszimmetrikusan osztódva létrehoznak egy újabb őssejtet és egy cisztoblaszt sejtet. A cisztoblaszt négy nem teljes mitotikus osztódást hajt végre, ami egy tizenhat sejtes szincíciumot eredményez. A cisztoblaszt mitotikus osztódásai során a citokinézis ugyanis nem teljes: az osztódási barázda helyén egy gyűrűcsatornának nevezett speciális képződmény alakul ki, ami a petekamrában a tizenhat ivarsejt között állandó citoplazmatikus összeköttetést biztosít. Az ivarsejtek közül így két sejtnek négy, két sejtnek három, négy sejtnek kettő és nyolc sejtnek egy gyűrűcsatornája van. Az egyik négy gyűrűcsatornával rendelkező sejt a petekamra poszterior pólusára kerül, és ott petesejtté differenciálódik. A fennmaradó tizenöt ivarsejtből poliploid dajkasejt lesz. A tizenhat ivarsejtet a germáriumban egy szomatikus eredetű sejtréteg, a follikuláris sejtek rétege burkolja be. Ezután a petekamra a germáriumból vitelláriumba jut, ahol érett petévé fejlődik (2D és 2E ábra). A pete fejlődése morfológiai jellegek alapján tizennégy stádiumra osztható, ahol a vitelláriumba történő belépés a második, a peteérés befejeződése pedig a tizennegyedik stádiumot jelenti.



2. ábra A petesejt fejlődésének áttekintése. **A,** A *Drosophila* petefészke és a hozzá kapcsolódó szerveknek a rajza. **B,** Egy egyedi petecső rajza, benne a különböző fejlődési stádiumú petekamrákkal. **C,** A germárium élethű és sematikus rajza. A germáriumban található különböző sejteket vonalak jelzik. **D,** Egy tizedik stádiumú petekamra rajza. A petesejt magját és a különböző sejteket vonalak jelzik. **E,** Az érett *Drosophila* pete rajza.

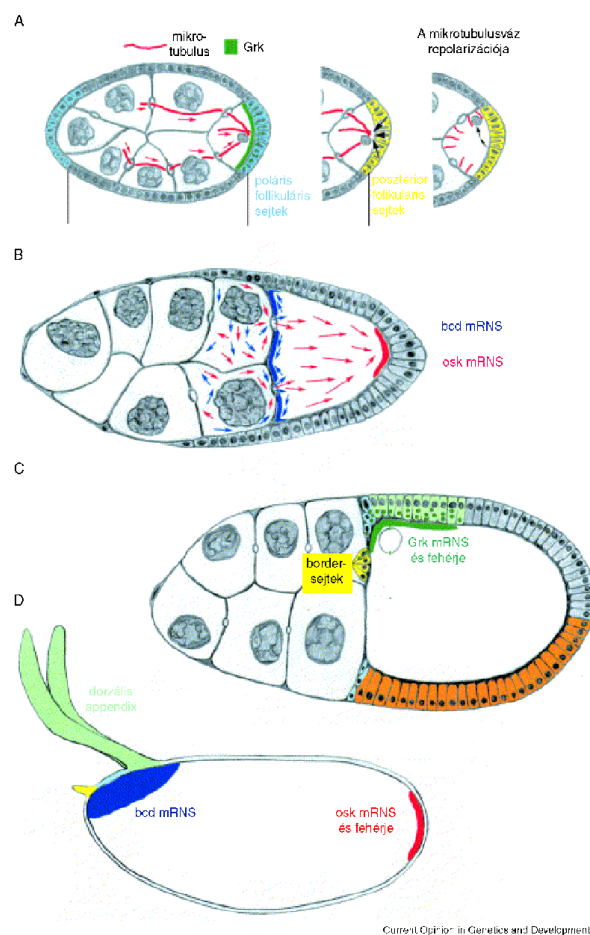
Anyagszállítás a dajkasejtekből a petesejtbe

A peteérés során a *Drosophila* petesejtje a transzkripció szempontjából csaknem teljesen inaktív, ezért a petesejt éréséhez szükséges fehérjéket és mRNS-eket a dajkasejtek állítják elő.

A dajkasejtekben termelt anyagok szállítása a petesejtbe a sejtváz mentén a gyűrűcsatornákon át történik. Ez a folyamat egy lassú, korai és egy gyors, késői szakaszra osztható. A peteérésnek korai szakaszában egyes citoplazmatikus szemcsék szelektíven szállítódnak a dajkasejtekből a gyűrűcsatornákon át a petesejtbe (BOHRMANN és BIBER 1994). Ebben a lassú anyagáramlásban fontos szerepük van a mikrofilamentumoknak hiszen ezeknek a partikulumoknak a mozgása érzékeny az aktint depolimerizáló vegyszerekre. A dajkasejtekből a petesejtbe történő anyagszállításnak fontos elemei a mikrotubulusok is: a mikrotubulusokat depolimerizáló kolhicines kezelés megakadályozza egyes RNS-ek szállítását a dajkasejtekből a petesejtbe (POKRYWKA és STEPHENSON 1995). Az anyagszállítás késői lépése a peteérés tizedik stádiumában elkezdődő gyors anyagáramlás, ami a dajkasejtek maradék citoplazmáját átjuttatja a petesejtbe (ROBINSON és COOLEY 1997). Ez úgy történik, hogy a dajkasejtek szubkortikális aktinváza összehúzódik és a gyűrűcsatornákon át a dajkasejt teljes citoplazmáját átpréseli a petesejtbe. A dajkasejtek összehúzódásakor a sejtmagok nem jutnak át a petesejtbe, mert a dajkasejtek sejthártyájáról kiinduló citoplazmatikus aktinszálak maghártyához kapcsolódva a sejtmagot a dajkasejt közepén rögzítik. A gyors citoplazmatranszport ideje alatt a petesejt citoplazmája is áramlani kezd. Az ooplazma áramlása azonban mikrotubulusfüggő, a mikrotubulusok ekkor a petesejt kérge mentén rendeződnek el.

A dajkasejtekből a petesejtbe tartó szállítórendszerrel jutnak be a petesejtbe a peteéréséhez szükséges tápanyagok mellett a morfogén molekulák is. A morfogén molekulák jellegzetessége az, hogy a dajkasejtből a petesejtbe történő szállítás után a petesejten belül nem egyenletesen oszlanak el, hanem szigorúan meghatározott helyet foglalnak el. A morfogének közös jellemzője az is, hogy mRNS-ként lokalizálódnak, és a lokalizáció helyén a transzlációs gátlás alól felszabadulva helyspecifikusan transzlálódnak (JOHNSTONE és LASKO 2001; LIPSHITZ és SMIBERT 2000). A petesejt anterior pólusán lokalizált *bicoid*

(*bcd*) mRNS az embrionális anterior struktúrák, azaz a fej és a tor, helyét jelöli ki, a petesejt anterodorzális sarkában lokalizált *gurken* (*grk*) mRNS pedig az embrió dorzális-ventrális szimmetriáját szabja meg (3.ábra) (BERLETH és mtsai. 1988; NEUMAN-SILBERBERG és SCHUPBACH 1993). A petesejt poszterior pólusán lokalizált *oskar* (*osk*) mRNS jelöli ki a petesejtben azt a helyet, ahol a megtermékenyítés után az embrióban az embrionális ivarsejtek és a potroh kialakul (3.ábra) (EPHRUSSI és mtsai. 1991; KIM-HA és mtsai. 1991).



3.ábra A petesejt polaritásának kialakulása. **A,** A petesejtből szekretált GRK szignálfehérje hatására a petekamra poszterior pólusán poszterior follikuláris sejtek differenciálódnak, melyek egy ismeretlen természetű jelet küldenek a petesejtnak. Ennek hatására a petesejt mikrotubulusváza átpolarizálódik, a mikrotubulusok plusz végei a petesejt poszterior pólusa felé mutatnak. A petesejt magja ekkor a petesejt anterodorzális sarka felé vándorol. **B,** Az átpolarizálódott mikrotubulusváz szállítja *bcd* és az *osk* morfogén mRNS-eket a petesejt anterior illetve poszterior pólusára. **C,** A petesejt anterodorzális sarkában lokalizált *grk* mRNS és GRK fehérje kialakítja a petesejt dorzoventrális aszimmetriáját. **D,** Az érett pete a poszterior pólusán lokalizált *osk* mRNS kijelöli azt a helyet, ahol az embrióban az embrionális ivarsejtek és a potroh kialakul. A petesejt anterior pólusán lokalizált *bcd* mRNS az embrionális anterior struktúrák, azaz a fej és a tor, helyét jelöli ki. (Veit Riechmann and Anne Ephrussi, Axis formation during *Drosophila* oogenesis, Current Opinion in Genetics and Development 2001 (11)4 377. oldal, módosítva)

Az *osk* mRNS szállítása a petesejt poszterior pólusára

Az *osk* mRNS petesejten belüli helyes lokalizálásához nélkülözhetetlen az petesejt és a follikuláris sejtek közötti kommunikáció és a petesejt mikrotubulusvázáinak dinamikus átalakulása (LIPSHITZ és SMIBERT 2000; RAY és SCHUPBACH 1996). A petekamra fejlődésének korai stádiumaiban (1.-6. stádium) a mikrotubulusok a petesejt poszterior pólusán található mikrotubulus organizáló központból (MTOC) indulnak ki, és a gyűrűcsatornákon át behatolnak a dajkasejtekbe (3.ábra) (THEURKAUF és mtsai. 1992). Ezen mikrotubulusok mentén, a gyűrűcsatornákon át jut be a petesejtbe a dajkasejtekben átíródott *osk* mRNS egy ribonukleoprotein komplex tagjaként és ott egyenletesen eloszlik a citoplazmában (CLARK és mtsai. 1994; POKRYWKA és STEPHENSON 1995). Ezekben a korai stádiumokban a petesejt magja is a petesejt poszterior pólusán helyezkedik el. A mag körül található a lokalizált *grk* mRNS és a GRK fehérje. A petesejt poszterior pólusán a GRK fehérje szekretálódik, és aktiválja a poláris follikuláris sejteken található *Drosophila* EGF-receptort. Ennek hatására a poszterior póluson lévő poláris follikuláris sejtek poszterior poláris follikuláris sejté differenciálódnak, míg az anterior póluson lévő poláris follikuláris sejtek a jel hiányában anterior poláris follikuláris sejtekké (bordersejtek) alakulnak (3.ábra) (ROTH és mtsai. 1995). Később, a peteérés hatodik- hetedik stádiumában, a poszterior poláris follikuláris sejtek egy eddig ismeretlen természetű jelet küldenek a petesejtnek, melynek hatására a petesejt mikrotubulusváza repolarizálódik (GONZALEZ-REYES és mtsai. 1995; GONZALEZ-REYES és ST JOHNSTON 1994; ROTH és mtsai. 1995; RUOHOLA és mtsai. 1991). A repolarizáló jel inaktíválja a poszterior MTOC-t és ezzel egyidőben a petesejt anterior pólusán egy diffúz MTOC alakul ki (3. ábra). Ez a folyamat egy fordított orientációjú mikrotubulusvázat eredményez, melynek plusz végei a poszterior pólusra mutatnak (Theurkauf 1992). A mikrotubulusváznak ez az átrendeződése szükséges az *osk* mRNS

poszterior pólusra történő szállításához (CLARK és mtsai. 1994; CLARK és mtsai. 1997; LANE és KALDERON 1994). A mikrotubulusváz repolarizációját követően, a peteérés nyolcadik stádiumában az ekkor még az anterior póluson felhalmozódott *osk* mRNS elkezd átszállítódni a petesejt poszterior pólusára, és a kilencedik stádiumtól az *osk* mRNS már kizárólag a petesejt poszterior pólusán található meg (3. ábra) (EPHRUSSI és mtsai. 1991; KIM-HA és mtsai. 1991). Számos tény bizonyítja, hogy az *osk* mRNS anterior-poszterior irányú szállítását a mikrotubulusváz végzi. A *grk*, *capuccino*, *spire*, *chikadee*, *PKA*, *Notch*, *Delta*, *laminin A*, *Merlin*, *par1* géneket érintő mutációk hibás mikrotubulusvázat és ezáltal hibás *osk* mRNS lokalizációt eredményeznek (LANE és KALDERON 1994; MACDOUGALL és mtsai. 2001; MANSEAU és mtsai. 1996; RUOHOLA és mtsai. 1991; SHULMAN és mtsai. 2000; THEURKAUF 1994; TOMANCAK és mtsai. 2000; XU és mtsai. 1992). A mikrotubulusváz szerepét bizonyítja az is, hogy a Dynein mikrotubuláris motorfehérje illetve az Kinesin motorfehérjével összekapcsolt β -Galaktozidáz riporterfehérje (Kin: β -Gal) a petesejt poszterior pólusán lokalizálódik, és ez a lokalizáció ugyanazoknak a géneknek a helyes működésétől függ, melyek a helyes mikrotubulus-polaritáshoz, és ezáltal a helyes *osk* mRNS lokalizációhoz is szükségesek (CLARK és mtsai. 1994; LANE és KALDERON 1994; LI és mtsai. 1994). A mikrotubulusokat depolimerizáló kolhicines kezelés megakadályozza az *osk* mRNS poszterior pólusra történő szállítását (CLARK és mtsai. 1994; POKRYWKA és STEPHENSON 1995). A mikrotubulusok plusz vége felé mozgó KinesinI motorfehérje nehéz láncában történt mutáció is megakadályozza az *osk* mRNS poszterior irányú mozgását és ektopikus *osk* mRNS- felhalmozódást eredményez a petesejt anterior pólusán (BRENDZA és mtsai. 2000). Az *osk* mRNS tehát a KinesinI motorfehérje segítségével a mikrotubulusok plusz vége felé mozogva jut el a poszterior pólusra. A *kinesinI* mellett a *staufer* (*stau*) és a *barentsz* gének mutációi szintén az *osk* mRNS

anterior felhalmozódását okozzák, a mikrotubulusváz ezekben a mutánsokban azonban ép marad (EPHRUSSI és mtsai. 1991; VAN EEDEN és mtsai. 2001).

A mikrotubulusokon kívül áttételesen a mikrofilamentumok is szerepet játszanak az *osk* mRNS szállításában: a petesejtben ugyanis az aktinváz szükséges a normális mikrotubulus- hálózat fenntartásához. CytochlasinD- kezelés és egyes aktinkötő fehérjék (*capu*, *spire*, *chic*) mutációinak hatására a petesejt mikrotubulusváza nem megfelelő időben alakul át, és korai mikrotubulusfüggő citoplazmaáramlás indul meg a petesejtben (EMMONS és mtsai. 1995; THEURKAUF 1994), ami megakadályozza az *osk* mRNS és az OSK fehérje lokalizációját a poszterior póluson (CLARK és mtsai. 1994).

A sejtvezeték mellett a petesejt belső membránjainak épsége is szükséges az *osk* mRNS szállításához. Az endoplazmatikus retikulum vezikuláinak homotipikus fúziójában szerepet játszó *Ter94* gén mutánsaiban az *osk* mRNS hibásan lokalizálódik (RUDEN és mtsai. 2000). Az endoplazmatikus retikulum mRNS lokalizációban játszott szerepére utal az is, hogy az emlős fibroblaszt sejtekben a STAU fehérje szorosan kapcsolódik az endoplazmális retikulumhoz, és szerepet játszik egyes mRNS-ek szállításában (ROEGIERS és JAN 2000; WICKHAM és mtsai. 1999). A belső membránok hatása az *osk* mRNS lokalizálásában valószínűleg szintén áttételesen, a mikrotubulusvázon keresztül valósul meg. Elképzelhető, hogy a vezikulák a mikrotubulusok plusz végeinek stabilizálásában játszanak szerepet. Egy másik elmélet szerint a mikrotubulusok plusz végei a membránvezikulákhoz tapadhatnak, és a vezikulák juttatnák el a plusz végeket a petesejt poszterior pólusára (DOLLAR és mtsai. 2002).

Az *osk* mRNS és az OSK fehérje rögzülése a poszterior póluson

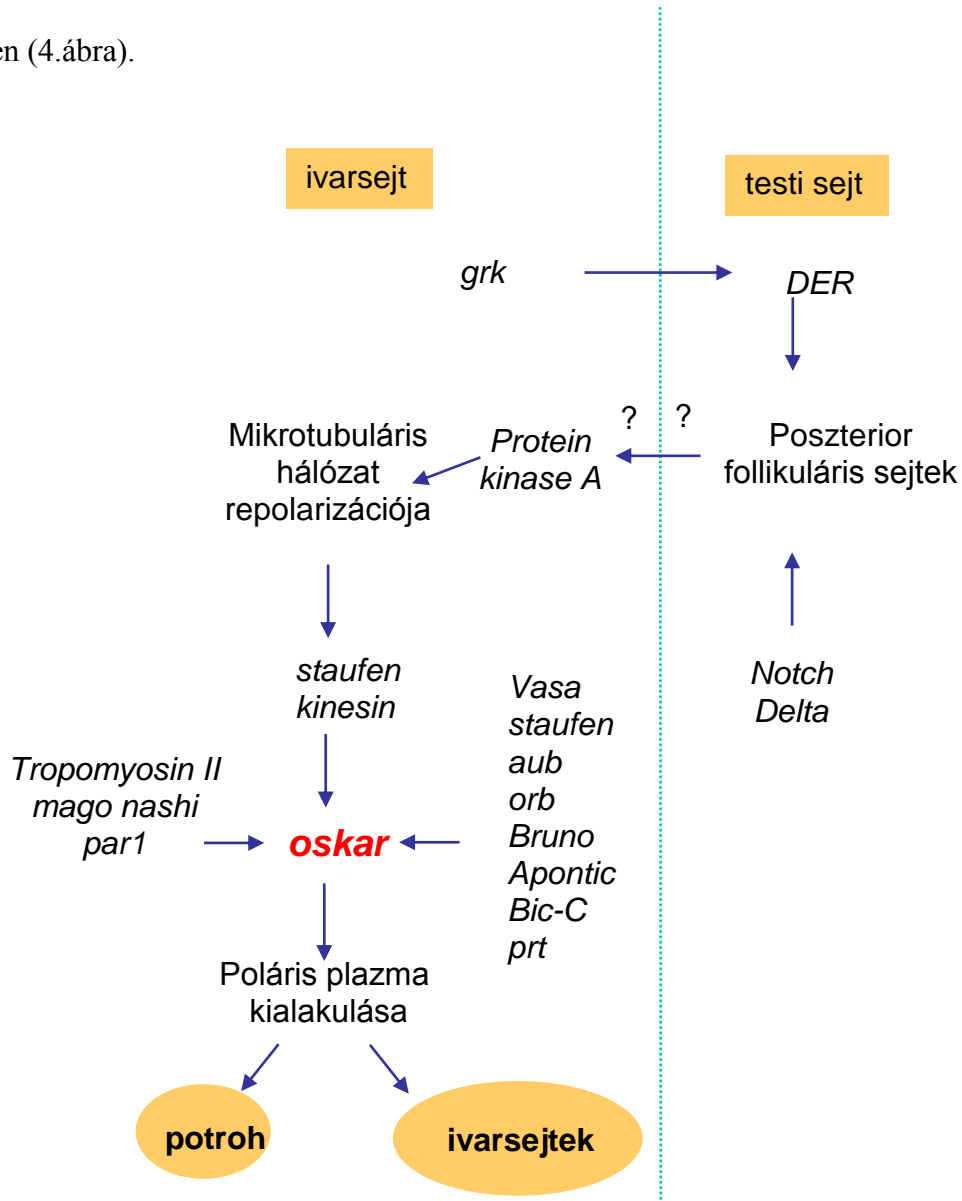
A dajkasejtekből a petesejtbe történő, és a petesejten belüli szállítás közben az *osk* mRNS transzlációja gátolt (összefoglalva: ld. (LIPSHITZ és SMIBERT 2000)). A poszterior póluson

azonban ez a gátlás megszűnik és a peteérés kilencedik stádiumában OSK fehérje képződik. Az *osk* lokalizáció következő lépése az *osk* mRNS és az OSK fehérje poszterior póluson történő rögzítése. A lokalizált *osk* mRNS rögzítésének egyik fontos tényezője maga az OSK fehérje (MARKUSSEN és mtsai. 1995; RONGO és mtsai. 1995). Azokban a petesejtekben ugyanis, melyek az *osk* génben nonszensz mutációkat hordoznak, nem képződik funkcióképes OSK fehérje és az *osk* mRNS nem rögzül a poszterior póluson. Ezekben a mutáns petekamrákban az *osk* mRNS kilencedik stádiumban helyesen eléri a poszterior pólust, és a lokalizációja fennmarad a tizedik stádiumig. Ezután azonban az *osk* mRNS nem marad a poszterior póluson, hanem egyenletesen eloszlik a petesejt citoplazmájában (KIM-HA és mtsai. 1991). Közvetett bizonyítékok azt sugallják, hogy az *osk* mRNS és az OSK fehérje rögzítését a poszterior póluson nem a mikrotubulusok, hanem a mikrofilamentumok végzik. A peteérés tizedik stádiumában lévő petesejt poszterior pólusára injektált in vitro szintetizált *osk* mRNS rögzült a poszterior póluson. Ezt a folyamatot a mikrotubulusokat depolimerizáló kolhicines kezelés nem befolyásolta (GLOTZER és mtsai. 1997). A mikrotubulusokhoz kapcsolódó motormolekulák, -a Dynein és a Kin:β-Gal fehérjék-, a peteérés tizedik stádiumában, amikor a mikrotubulusok anterior-poszterior polarizáltsága megszűnik, elhagyják a petesejt poszterior pólusát, ami azt jelzi, hogy mikrotubulusoktól független szereplők szükségesek a fehérjék és mRNS-ek poszterior póluson történő rögzítéséhez (CLARK és mtsai. 1994; LI és mtsai. 1994). A petesejt mikrotubulusainak kolhicines destabilizálása szintén megszüntette a Kin:β-Gal lokalizációját a poszterior póluson, míg az *osk* mRNS és az OSK fehérje poszterior lokalizációja megmaradt (CLARK és mtsai. 1994). A mikrotubulusokkal szemben, az aktinváz fontos szerepére utal az a tény, hogy az aktinkötő fehérjét kódoló *TmII* génben történt mutációk megakadályozták az *osk* mRNS rögzülését a poszterior póluson (ERDELYI és mtsai. 1995; TETZLAFF és mtsai. 1996).

A poláris plazma kialakulása

Az *osk* mRNS és az OSK fehérje a rögzülésük után a poszterior póluson egy rendkívül speciális citoplazmarészt, a poláris plazmát alakítja ki (EPHRUSSI és mtsai. 1991; KIM-HA és mtsai. 1991), mely tartalmazza azokat az mRNS-eket és fehérjéket, melyek a megtermékenyítés után az embrióban a potroh és az ivarsejtek kialakítását irányítják. A poláris plazmában jelen van a *nanos* (*nos*) mRNS, amely az embrionális abdomen kialakításához szükséges (3. ábra) (EPHRUSSI és mtsai. 1991; WANG és LEHMANN 1991). A poláris plazmába gyűlnek össze azok a faktorok is (*germ cell-less*, *mtlrRNA* és a *polar granule component RNA*), melyek az embrionális ivarsejtek kialakításában nélkülözhetetlenek (IIDA és KOBAYASHI 1998; JONGENS és mtsai. 1992; MAHOWALD 2001; NAKAMURA és mtsai. 1996). Az *osk* lokalizációja szükséges és elégséges feltétele a poláris plazma kialakulásának. Ektopikusan lokalizált *osk* mRNS ektopikus poláris plazmát, ezáltal ektopikus ivarsejteket és potrohot indukál (EPHRUSSI és LEHMANN 1992). Poláris plazma nélküli petesejtekből potroh és ivarsejt nélküli embriók fejlődnek (EPHRUSSI és mtsai. 1991). Ezt a fenotípust poszterior fenotípusnak hívjuk. A poszterior fenotípus géndózisfüggő, két összetevője, a potroh- és az ivarsejthiány, nem egyformán érzékeny a lokalizált *osk* mennyiségére. A lokalizált *osk* géntermékek mennyiségének kismértékű csökkenése potrohhal rendelkező, de ivarsejthiányos embriókat eredményez, míg a lokalizált *osk* géntermékek teljes hiányában az embriónak se potroha, se ivarsejtjei nincsenek (1. ábra). Az 1990-es évek elején számos gént azonosítottak, melyek mutációi poszterior fenotípusú embriókat eredményeznek, és a poszterior csoport génjeinek nevezték el őket. A klasszikus poszterior géneket (*cappuccino*, *spire*, *stau*, *osk*, *tudor* és *valois*) potroh- és ivarsejthiányos fenotípusuk alapján azonosították (összefoglalva: ld. (ST JOHNSTON és NUSSLEIN-VOLHARD 1992)). Ivarsejthiányos fenotípusuk alapján a poszterior csoport további génjeit (*TmII*, *mago nashi* (*mago*), *pipsqueak*) sikerült azonosítani (BOSWELL és mtsai. 1991; ERDELYI és mtsai.

1995; HOROWITZ és BERG 1995). Napjainkban az összes olyan gént a poszterior géncsoportba soroljuk, melyek szerepet játszanak a poláris plazma kialakulásában vagy működésében (4.ábra).



4.ábra Az *osk* géntermékek lokalizációjához szükséges fontosabb gének hierarchiája. A petesejtből a környező follikuláris sejtekhez küldött jelfelhérjét a *grk* gén kódolja. A *grk*-jel feldolgozásához és a poszterior follikuláris sejtek differenciálódásához szükség van a *DER*, *Notch* és a *Delta* génekre. A poszterior follikuláris sejtek felől érkező jel mibenléte ismeretlen, de bizonyos, hogy a *PKA* aktivitás közvetíti a mikrotubulusokra, melyeknek a polaritása átalakul. A repolarizált mikrotubulusvázon a *kinesin* és a *staufen* segítségével az *osk* mRNS a petesejt poszterior pólusára jut. Az *osk* mRNS helyes szállításhoz és/vagy rögzüléshez szükség van a *Tropomyosin*, *mago nashi*, és a *par1* génekre, míg a *vasa*, *staufen*, *aub*, *orb*, *Bruno*, *Apontic*, *Bic-C* és a *prt* gének az *osk* mRNS transzlációját szabályozzák.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Drosophila törzsek

A muslicatörzseket hagyományos élesztő-kukoricaliszt táptalajon tartottuk fenn. A keresztezéseket 25 °C-on végeztük. Az *Oregon-R* törzset használtunk vad típusként. A *TmII^{eg9}*, *TmII^{eg20}* és a *TmII^{el4}* alléleket a *TmII^{gs1}* allélból a P elem excíziójával állítottuk elő. A *TmII^{eg9}* és *TmII^{eg20}* mutációk homozigóta formában gyenge illetve erős ivarsejthiányos fenotípust okoznak, a *TmII^{el4}* allél pedig letális. (ERDÉLYI és mtsai 1995). Az *osk^{P187}* egy erős hipomorf P-elem indukált allél. A *T(2;3) ITS9*, *Fab7*, a *T(2;3) TSR-7* transzlokáció szinonimája (SIPOS és mtsai. 1998). A *CyO*, *P{kl6-10}* kromoszóma a géncsapda P-elemet hordozza a *CyO* kromoszómán. A *w/w; T(2;3)CyO,DTS-513;TM2,Su(DCS)/Ketel^{DCS};+* törzs a *CyO* kromoszómán a *DTS-513* domináns hőérzékeny letális mutációt hordoz. A *Su(DCS)* mutáció a *Ketel^{DCS}* mutáció EMS-indukált domináns szupresszora (ERDÉLYI M., személyes közlés). A többi mutáns leírásához lásd (LINDSLEY és ZIMM G.G 1992).

A mutáns fenotípusok vizsgálata

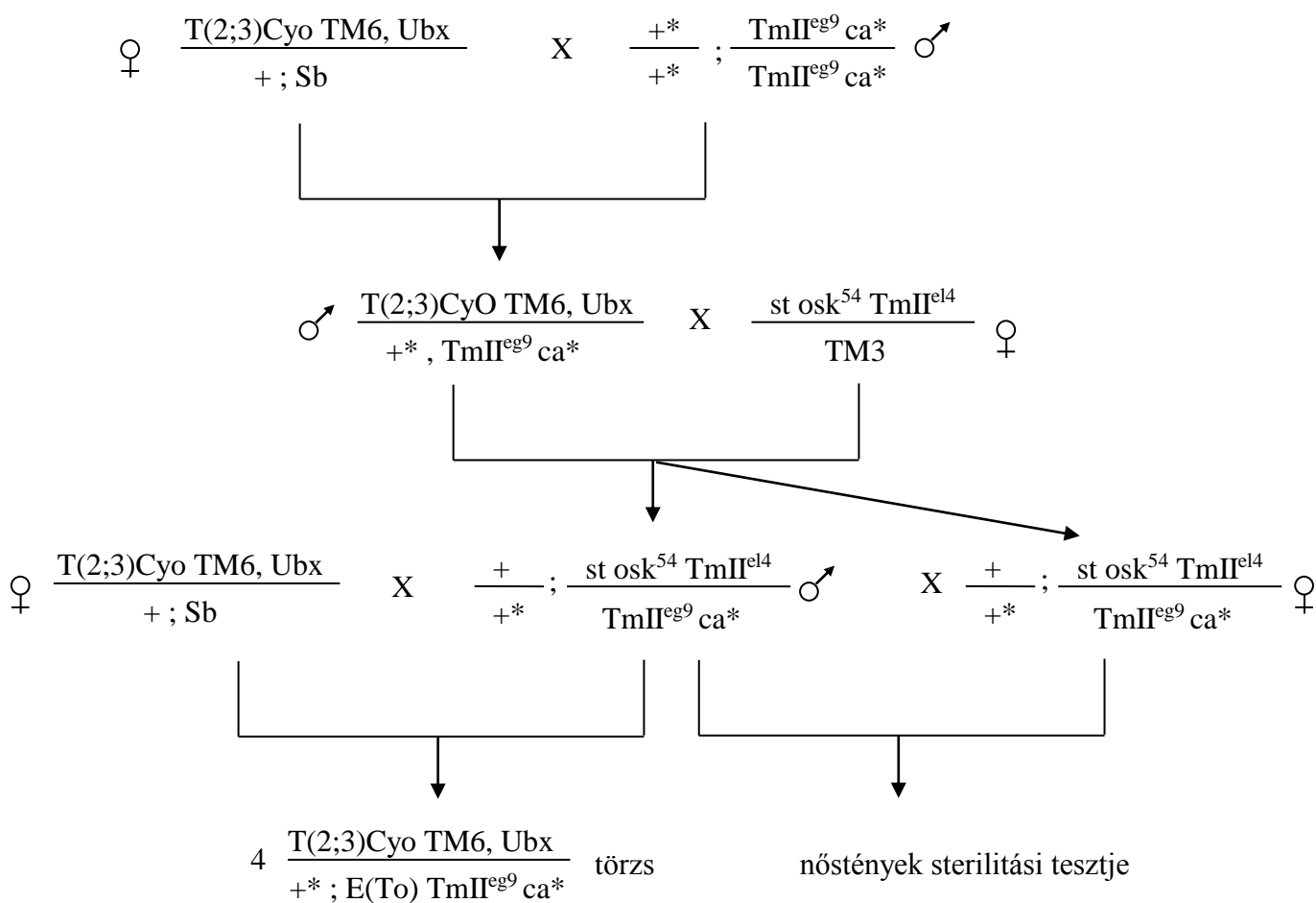
Embrionális kutikulapreparátumok készítéséhez egynapos petéket 50%-os Chlorox hypoval dekarionizáltunk, vízzel mostunk, Hoyer médium (30 g gumiarabikum, 50 ml desztillált víz, 200 g vízmentes klorálhidrát, 20 g glicerin):tejsav 1:1 arányú elegyében ágyasztuk, és egy napig 60 °C-on inkubáltuk. A felnőtt ivarsejthiányos fenotípus vizsgálatához mutáns nőtények felnőtt hím és nőtény utódait *Drosophila* Ringer oldatban boncoltuk, ivarszerveiket elkülönítettük. Az így kinyert heréket és petefészkeket *Drosophila* Ringer oldatban, fénymikroszkóppal vizsgáltuk meg. Mivel az ivarsejthiányos gonádokban csak az ivarszerv szomatikus eredetű sejtjei vannak jelen, mérete és morfológiája erősen eltér a vad típusétól. A csökevényes, csak szomatikus sejtekből álló ivarszerveket ivarsejthiányosnak tekintettük.

Felnőtt kutikulapreparátumok készítéséhez az állatokat 10 percig forró 10%-os KOH oldatban inkubáltuk. A KOH oldatot eltávolítottuk, a legyeket háromszor forró vízben mostuk. A kutikulát Hoyer's médiumba ágyasztuk és egy napig 60 °C-on inkubáltuk.

Genetikai interakción alapuló mutánsizolálás

Az *E(To)* mutációkat $+/+$; *TmII^{eg9} ca/TmII^{eg9} ca* mutáns háttéren indukáltuk. A $+/+$; *TmII^{eg9} ca/TmII^{eg9} ca* hímeket 8 órán át 25 mM etil-metil-szulfonát (EMS) mutagént tartalmazó 1%-os glükózoldattal etettük (LEWIS és BACHER 1968). Az EMS-kezelt hímeket *T(2;3)CyO TM6, Ubx / +; Sb* szüzekkel kereszteztük. Az utódnemzedékben megjelenő, mutagenizált második és harmadik kromoszómát hordozó *T(2;3)CyO TM6, Ubx / +; TmII^{eg9} ca* hímeket egyenként *st osk⁵⁴ TmII^{el4} / TM3, Sb Ser* szüzekkel kereszteztük. Ezeknek a hímeknek a *CyO* és a *TM6, Ubx* kromoszómái között nagy kromoszómaszakaszok kölcsönösen kicserélődtek, így csak azon utódaik életképesek, amelyek együtt öröklik a *CyO* és a *TM6, Ubx* vagy a mutagenizált második és harmadik kromoszómát. Ezzel a módszerrel a két mutagenizált kromoszóma együtt adódik át a következő nemzedéknek. A párkeresztezések eredményeként az F2 generációban kikelő *E(To)/+; TmII^{eg9} ca / st osk⁵⁴ TmII^{el4}* illetve $+/+$; *E(To) TmII^{eg9} ca / st osk⁵⁴ TmII^{el4}* nőtények ötös csoportját petéztettük minden mutagenizált kromoszómát hordozó vonalnál. A nőtények sterilitásának a mértékét a kikelt és az elpusztult peték arányának becslésével állapítottuk meg. A kontrollként használt $+/+$; *TmII^{eg9} ca / st osk⁵⁴ TmII^{el4}* nőtények 65,6%-os sterilitását meghaladó steril fenotípust az érzékenyített háttér és az újonnan indukált mutáció közötti genetikai interakciónak tekintettük. Az erős interakciót mutató vonalaknál az *E(To)/+; TmII^{eg9} ca / st osk⁵⁴ TmII^{el4}* illetve $+/+$; *E(To) TmII^{eg9} ca / st osk⁵⁴ TmII^{el4}* hímekből kiindulva *T(2;3)CyO TM6, Ubx* transzlokációs balanszer kromoszómát felhasználva stabil törzseket alapítottunk. Mivel a törzsalapításhoz használt *E(To)/+; TmII^{eg9} ca / st osk⁵⁴ TmII^{el4}* illetve $+/+$; *E(To) TmII^{eg9} ca / st osk⁵⁴ TmII^{el4}* hímekben a mutagenizált

második kromoszóma nem hordozott markermutációt, ezért a második kromoszóma szegregációját nem tudtuk ebben a lépésben genetikai markerekkel követni. Az F4 nemzedékben emiatt négy párhuzamos alvonalat hoztunk létre egyedi hímekből minden szelektált vonal esetében, hogy legalább egy, a mutagenizált második kromoszómát biztosan hordozó törzset alapíthassunk. A keresztezések menetét az 5. ábra mutatja.

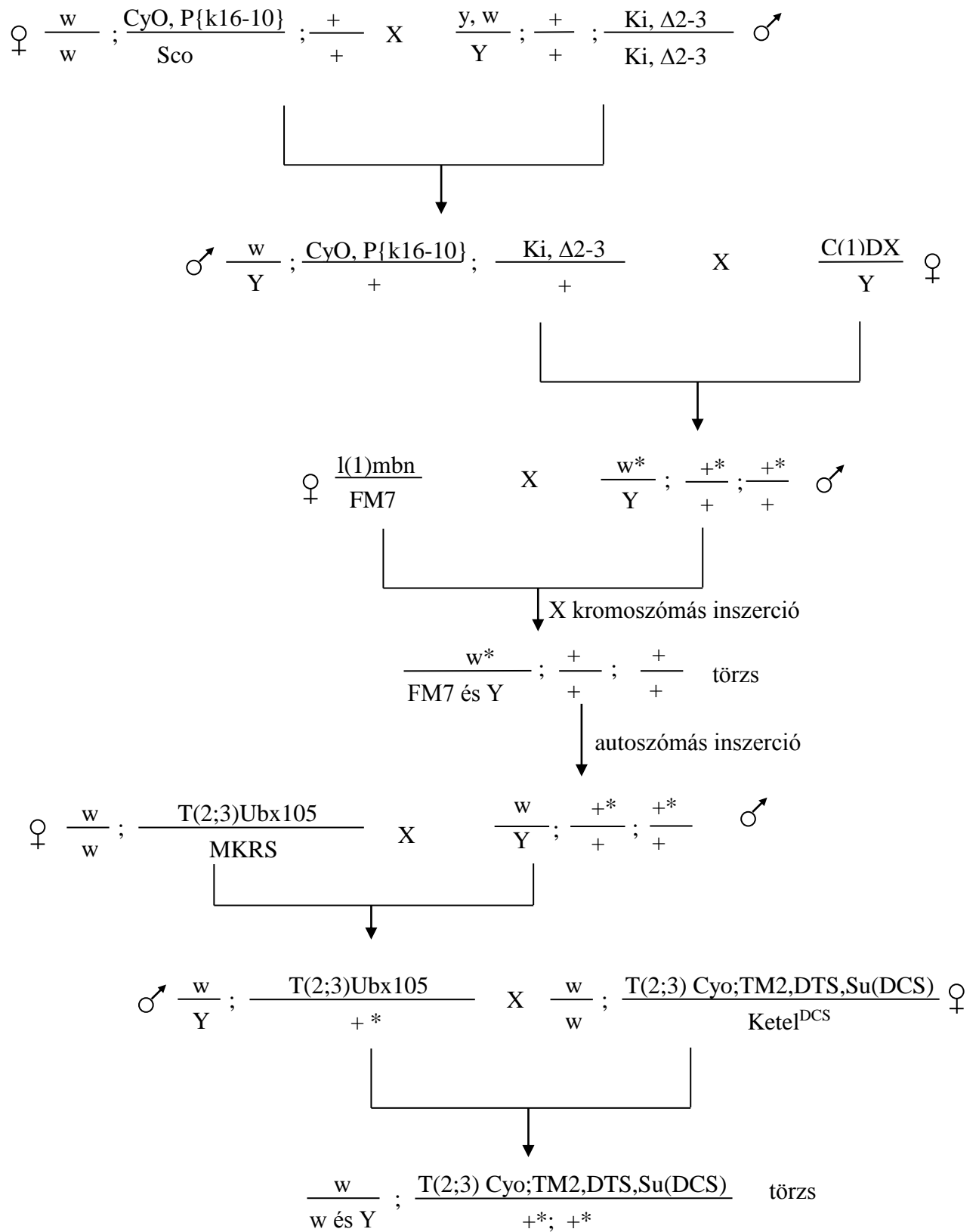


5. ábra A genetikai interakción alapuló mutánsizolálási kísérlet keresztezéseinek menete.

Géncsapda elven alapuló P-elemes mutagenézis

Géncsapda elven alapuló P-elemes mutagenézist *miniwhite* és GFP markergéneket hordozó „géncsapdázó” P-elemmel hajtottuk végre. A géncsapda módszer lényege, hogy a mutagén transzpozonba beépített markergének csak akkor fejeződnek ki, ha a transzpozon génbe épült

be (LUKACSOVICH és mtsai. 2001). Így a *miniwhite* gén csak azokban az egyedekben fejeződik ki, és okoz *w* mutáns háttéren piros szemszínt, amelyekben a P-elem egy gén belsejébe épült be. A génen kívüli P-elem beépüléseket hordozó egyedekben a mutagén P-elem *miniwhite* markergénje nem, vagy csak nagyon alacsony szinten fejeződik ki, ezért az ilyen állatok szeme halványsárga. A sötétpiros szemű állatokra szelektálva így olyan P-elem inszerciós mutánsokat tudunk izolálni, melyekben a „génscapdázó” P-elem egy gén belsejébe épült be. A mutánsizolálási kísérlet során a génscapda P-elemet hordozó *w/w; CyO, P{k16-10}/Sco* szűz nőstényeket *y,w/Y; Ki, Δ2-3/ Ki, Δ2-3* hímekkel kereszteztük. Az F1 utódok közül *w/Y; CyO, P{k16-10}/+; Ki,Δ2-3/+* hímeket gyűjtöttünk és egyenként kereszteztük őket *C(1)DX/Y* genotípusú szűz nőstényekkel (jump starter keresztezés). Az F2 utódgenerációból olyan sötétpiros szemszínű hímeket gyűjtöttünk, melyek sem a *Cyo, P{k16-10}*, sem a *Ki, Δ2-3* kromoszómát nem hordozták. Ezek a hímek új P-elem beépüléseket hordoztak az X kromoszómájukon vagy valamelyik autoszómán. Törzsalapításhoz és a beépülés térképezéséhez ezeket az új P-elem inszerciót hordozó hímeket *l(1)mbn/FM7* nőstényekkel kereszteztük. Ha a P-elem beépülése az X kromoszómára történt, akkor ebből a keresztezésből kiegyensúlyozott *w P-elem/FM7* törzs alapult. Ha a P-elem beépülés nem X-kromoszómás volt, akkor ebben a lépésben nem alakult ki kiegyensúlyozott törzs, és az utódok között megjelentek fehér szemű hímek is. Ezekből a vonalakból a P-elem inszerciót hordozó, azaz piros szemű, *w/Y; +/+; +, P-elem/+* illetve *w/Y; +/+; +/+, P-elem* genotípusú hímeket gyűjtöttünk, és kereszteztük őket *w/w; T(2;3)Ubx105/MKRS* transzlokációs kromoszómát hordozó nőstényekkel. A kikelt *w/Y; +,P-elem;+ / T(2;3)Ubx105* illetve *w/Y; +;+,P-elem/ T(2;3)Ubx105* hímeket 18°C-on kereszteztük *w/w; T(2;3)CyO;TM2,DTS,Su(DCS)/ Ketel^{PCS}* nőstényekkel. Az utódgenerációból automatikusan *w; +,P-elem;+ / T(2;3)CyO;TM2,DTS,Su(DCS)* illetve *w; +;+,P-elem/ T(2;3)CyO;TM2,DTS,Su(DCS)* törzsek alapultak. A keresztezések menetét az 6. ábra tartalmazza.



6. ábra A géncsapda elven alapuló mutánsizolálási kísérlet keresztezéseinek menete.

Az EMS mutagenézis hatékonyságának vizsgálata

A mutagenézis hatékonyságát az EMS által indukált harmadik kromoszómás recesszív letális mutációk gyakoriságával adtuk meg. Vad típusú hímeket 8 órán át 25 mM etil-metil-szulfonát (EMS) mutagént tartalmazó 1%-os glükózoldattal etettük (LEWIS és BACHER 1968). A mutagenizált hímeket egyenként *TM6*, *D³ / TM3*, *Sb Ser* nőtényekkel kereszteztük. A következő generáció egyedeit egymás között kereszteztük, és a mutagenizált kromoszómára homozigóta egyedek megjelenését figyeltük. A homozigóták hiánya azt jelzi, hogy recesszív letális mutációt indukáltunk a harmadik kromoszómán. A kapott eredményeket Poisson-eloszlás szerint értékeltük.

Az *E(To)* mutánsok vizsgálata a *TmII^{eg9} / TmII^{eg20}* érzékenyített rendszerben

E(To); TmII^{eg9} ca / T(2;3)Cyo TM6, Ubx illetve *+*; *E(To) TmII^{eg9} ca / T(2;3)Cyo TM6, Ubx* nőtényeket *TmII^{eg20}* homozigóta hímeikkel kereszteztünk. Az utódgenerációból kikelő *E(To) / +; TmII^{eg9} ca / TmII^{eg20}* illetve *+ / +; E(To) TmII^{eg9} ca / TmII^{eg20}* heterozigóta nőtényeket vad típusú hímeikkel kereszteztük. A felnőtt hím és nőtény utódokat felboncoltuk és a ivarsejthiányos fenotípusukat vizsgáltuk.

Komplementációs analízis

E(To); TmII^{eg9} ca / T(2;3)Cyo TM6, Ubx illetve *+*; *E(To) TmII^{eg9} ca / T(2;3)Cyo TM6, Ubx* nőtényeket kereszteztünk a következő mutáns alléleket hordozó hímeikkel: *osk^{P187}*, *nos^{L7}*, *nosRD*, *pumilio⁶⁸⁰*, *stau^{D3}*, *valois^{PG}*, *egalitarian^{RC12}*, *tudor^{WC8}*, *cappucino^{RK}*, *spire^{RP}*, *vasa⁰¹⁴*, *BicaudalD⁷¹³⁴*, *BicaudalC^{YC33}*, *aubergine^{QC42}*, *arrest^{PA62}*, *oo18 RNA-binding protein^{mel}*, *mago¹*, *chicadee^{UC57}*. A transz-heterozigóta nőtények sterilitását petéztetéssel, utódaik ivarsejthiányos fenotípusát boncolással vizsgáltuk. Komplementációs analízist végeztünk az

E(To) vonalak között is. Minden *E(To)* transz-heterozigóta kombináció steril és ivarsejthiányos fenotípusát megvizsgáltuk.

A *Moe*^{GT193}/*Y* hímeket kereszteztük a következő mutáns allélokat hordozó nőtényekkel: *EP(X)1373*, *l(1)G0020*^{G0020}, *l(1)G0415*^{G0415}, *l(1)G0404*^{G0404}, *l(1)G0067*^{G0067}, *l(1)G0323*^{G0323}. A transz-heterozigóta nőtények sterilitását petéztetéssel, utódaik ivarsejthiányos fenotípusát boncolással vizsgáltuk.

Az *E(To)* mutációk térképezése

A mutagenizált második és harmadik kromoszómák szétválasztásához *SM6b*; *MKRS* / *ITS*⁹ *Fab7* nőtényeket +*; *TmII*^{eg9} *ca** / *T(2;3)Cyo TM6*, *Ubx* hímeikkel kereszteztünk (a * az újonnan indukált mutációt jelöli). A kikelt +*/ *SM6b* ; *TMII*^{eg9} *ca**/*MKRS* hímeiket *SM6b/Sco* és *TM3*, *Sb Ser* / *TM6*, *D*³ nőtényekkel kereszteztük. Az utódnemzedékből olyan hímeket és nőtényeket gyűjtöttünk, amelyek csak a mutagenizált második vagy harmadik kromoszómát hordozzák *SM6b* illetve *TM3*, *Sb Ser* kromoszómával balanszírozva. A mutagenizált második és harmadik kromoszómákra homozigóta egyedeket fenotípusát minden *E(To)* vonal esetében megállapítottuk.

Az *E(To)* mutációk meiotikus térképezéshez *E(To)/al dp b pr c px sp* illetve *E(To)/ru h th st cu sr e ca* nőtényeket kereszteztünk *al dp b pr Bl c px sp/SM1* illetve *ru h th st cu sr Pri e ca/TM6 Ubx* hímeikkel. A rekombináns *E(To)* kromoszómákat *SM6b* illetve *TM3*, *Sb Ser* kromoszómával balanszíroztuk.

Ivarsejtklónok analízise

A *Rab11* és a *Dmoe* allélok homozigóta ivarsejtklónjait az FLP-DFS technika alkalmazásával hoztuk létre (CHOU és PERRIMON 1996). Ez a módszer lehetővé teszi letális mutációk ivarsejtspecifikus hatásának vizsgálatát. A vizsgálni kívánt letális mutációra nézve a felnőtt

állat heterozigóta, így túlél, az ivarvonalba azonban homozigóta mutáns mozaik klónok jönnek létre. A mutációra homozigóta ivarsejtklónok előállítása helyspecifikus mitotikus rekombinációval történik, amit a hősekkel indukálható élesztő FLP rekombináz végez, mely a mitotikus rekombinációt csak a specifikus FRT célszekvencián hajtja végre. A rendszer tartalmazza a dominánsan nősténysterilitást okozó *ovoD* mutációt is, ami az oogenezist a negyedik peteérési stádiumban leállítja. Az az ivarsejt, amelyikben a mitotikus rekombináció megtörtént, megszabadul az *ovoD* mutációtól, így befejezheti az oogenezist, de homozigótává válik a vizsgálni kívánt mutációra.

A *Rab11^{ij2D1}*, *Rab11^{EP3017}*, *Rab11^{93Bi}* és *Rab11^{E(To)11}* mutációkat a *P{ry+t7.2=neoFRT}* 82B kromoszómára rekombináltuk. Hetvenkét órás *y w P{ry+t7.2=hsFLP}1/w; P{ry+t7.2=neoFRT} 82B Rab11 / P{ry+t7.2=neoFRT} 82B P{w+mc+ovoD1-18}* nőstény lárvákat hősokkoltunk 37 °C-on egy óráig. Az felnőtt mozaikos ováriumokat kiboncoltuk és *osk*, *grk* és *bcd* mRNS *in situ* hibridizációt végeztünk rajtuk.

A *Dmoe^{G0415}* *Dmoe^{G0323}*, *Dmoe^{G0404}* és a *Dmoe^{G0067}* alléleket a *w, P{w⁺FRT}9-2* kromoszómára rekombináltuk. Hetvenkét órás *w,P{w⁺FRT}9-2 Dmoe/ w,P{w⁺FRT}9-2 ovoD; P{ry+t7.2=hsFLP}/+* nőstény lárvákat hősokkoltunk 37°C-on egy óráig. A felnőtt mozaikos ováriumokat kiboncoltuk és *osk*, *grk* és *bcd* mRNS *in situ* hibridizációt és OSK immunfestést illetve aktinfestést végeztünk rajtuk.

mRNS *in situ* hibridizáció

Próbaként digoxigenin-jelölt DNS-t használtunk (Boehringer Mannheim). Az *osk* DNS próba az *osk* cDNS 2,1 kb-os *SacI* fragmentje (EPHRUSSI és mtsai. 1991), a *bcd* próba a *bcd* cDNS 2,5 kb-os *EcoRI* fragmentje (BERLETH és mtsai. 1988), a *grk* próba a *grk* cDNS *XhoI*-*NotI* fragmentje volt (NEUMAN-SILBERBERG és SCHUPBACH 1993). A hibridizációt EPHRUSSI és mtsai közleménye (EPHRUSSI és mtsai. 1991) alapján végeztük. A

petefészkeket PBT oldatban (130 mM NaCl, 7mM Na₂(HPO₄), 3mM Na(H₂PO₄), 0,1% TritonX-100, pH=7,5) boncoltuk, 4% paraformaldehidet 0.2% hypo-t és 10% DMSO-t tartalmazó PBT-ben 20 percig fixáltuk, majd kétszer 5 perces PBT-s mosás után 5 percig 50 µg/ml töménységű Proteináz K-val emésztettük. A Proteináz K-t 2mg/ml-es glicinnel blokkoltuk, a petefészkeket 5 percig PBT-vel mostuk, majd 20 percig -20°C-on metanol:DMSO 9:1 arányú elegyében inkubáltuk. Ezután a petefészkeket kétszer 5 percig PBT-ben majd 5 percig PBT:hibridizáló puffer 1:1 arányú elegyében mostuk. A prehibridizáció 55°C-on hibridizáló pufferben egy óráig tartott. A hibridizációt 16 órán át hibridizáló pufferben százszorosára hígított DIG-jelölt próbákkal végeztük 55°C-on, majd a petefészkeket 15 percig 55°C-os hibridizáló pufferben, aztán 15 percig szobahőmérsékletű PBT:hibridizáló puffer 1:1 arányú elegyében mostuk. A petefészkeket kétszer 10 percig PBT-vel öblítettük, majd egy órán át 2000-szeres hígítású ováriumon kimerített anti-DIG ellenanyaggal inkubáltuk (Boehringer Mannheim). Az ellenanyagot kétszer 10 perces PBT-s mosással távolítottuk el, majd a hibridizációs jelet mikrotiter lemezen 0,45% NBT-t és 0,35% X-foszfátot tartalmazó előhívó oldattal hívtuk elő (Boehringer Mannheim). A petefészkeket tárgylemezre helyeztük, és Aqua Poly/Mount médiumba ágyasztuk (Polysciences, Inc). A petekamrákat interferencia-kontraszt mikroszkóppal vizsgáltuk (Zeiss, Axiscope).

Immunfestések

A petefészkeket PBS (130 mM NaCl, 7mM Na₂(HPO₄), 3mM Na(H₂PO₄), pH=7,5) oldatban boncoltuk, 15 percig 4% paraformaldehidet tartalmazó PBS-ben fixáltuk, majd a fixáló oldatot háromszor 10 perces PBST-oldattal (PBS+0,1% TritonX-100) történő mosással távolítottuk el. A fixált ováriumokat három órán át blokkoló oldatban (2% BSA-t, 5% FCS-t és 0,02% nátrium-azidot tartalmazó PBST) tartottuk, majd 16 órán át szobahőn, ugyanebben

az oldatban hígított anti-OSK, anti-STAU, anti-Tubulin, anti- β -Galaktozidáz, anti-DE-cadherin illetve anti-DMOE ellenanyagokkal inkubáltuk. A DMOE ellenanyag hígítása 10000-szeres, a STAU ellenanyagé 2000- szeres, az OSK ellenanyagé 500-szoros, a Tubulin és a β -Galaktozidáz ellenanyagé 150-szeres volt. A DE-cadherin ellenanyagot hígítás nélkül használtuk. Az elsődleges ellenanyagokat háromszor 1 órás blokkoló oldattal történő mosással távolítottuk el, majd az ováriumokat szobahőn, 4 órán át blokkoló oldatban hígított másodlagos ellenanyaggal inkubáltuk. Az OSK és DMOE immunfestéshez Cy3-jelölt anti-nyúl ellenanyagot, a Tubulin immunfestéshez FITC-jelölt anti-patkány ellenanyagot, a β -Galaktozidáz immunfestéshez Cy3-jelölt illetve Cy2-jelölt anti-egér ellenanyagot, a STAU immunfestéshez pedig FITC-jelölt illetve Cy3-jelölt anti-nyúl ellenanyagot, a DE-cadherin immunfestéshez Cy2-jelölt anti-patkány ellenanyagot használtunk (Jackson Laboratories). A másodlagos ellenanyagok hígítása minden esetben 200-szoros volt. A meg nem kötött másodlagos ellenanyagot háromszor 1 órás PBST-s mosással távolítottuk el. Aktinfestéshez a petefészkeket ezután négy órán át 20-szoros hígítású rhodaminnal illetve OregonGreen-nel vagy rhodaminnal jelölt phalloidinben inkubáltuk (Molecular Probes). A meg nem kötött phalloidint 16 órás mosással távolítottuk el 4 °C-on. A petekamrákat 4% n-propil-gallátot tartalmazó 85%-os glicerinbe ágyasztuk (pH=9,5), és fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk (Zeiss Axioscope).

Kinesin: β -Galaktozidáz és Nod: β -Galaktozidáz festés

A petefészkeket PBT oldatban boncoltuk, majd 2,5% glutáraldehidet tartalmazó PBS oldatban fixáltuk. A petefészkeket kétszer mostuk PBT oldatban, majd festő pufferbe helyeztük [0,05 M $K_3(Fe(CN)_6)$, 0,05 M $K_4(Fe(CN)_6)$ PBS-ben]. Az X-gal oldat végső koncentrációja 0,2% volt. A festést 12 óráig, szobahőmérsékleten végeztük. A festett petefészkeket háromszor tíz percre mostuk PBT oldatban, majd Aqua Poly/Mount médiumba ágyasztuk (Polysciences, Inc).

Tau:GFP és Tubulin:GFP vizsgálata élő petefészkeken

A petefészkeket Voltalef 10S (Atochem) olajban boncoltuk ki. A preparátumot Voltalef olajban inverz konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. (Zeiss AxioVert).

Genomikus DNS izolálása

Harminc nőstény legyet 660 µl feltáró oldatban (0,2M szacharóz; 0,1M TRIS pH=9,2; 0,1M NaCl; 0,05M EDTA; 0,5% SDS) homogenizáltunk, majd 30 percig inkubáltuk 65°C-on. A feltárt legyekhez 100µl 8M K-acetátot adtunk, 30 percig jégen tartottuk, majd 10000 rpm fordulattal 10 percig 4°C-on centrifugáltuk. A felülúszóhoz 660 µl 96%-os etanolt adtunk, majd 10000 rpm fordulattal 5 percig centrifugáltuk. Az csapadékot 70%-os etanollal mostuk, megszáritottuk, és 100 µl TE-ben feloldottuk. A DNS oldat így µl-enként átlagosan 0,3 legyet tartalmazott.

Inverz PCR

10 µl (három légynek megfelelő) genomikus DNS-t 3 órán át 37 °C-on MboI enzimmel 25 µl térfogatban emésztettük. Az enzimet 30 percig 65 °C-on inaktiváltuk. Az emésztett genomikus DNS 10µl-ét T4 DNS-ligázzal 350µl végtérfogatban 16 órán át 4°C-on ligáltuk. A ligált DNS-t 0,1 térfogat 3M Na-acetát: 2,5 térfogat etanol elegyével kicsaptuk, centrifugálással ülepítettük, 70%-os etanollal mostuk, szárítottuk, majd 10 µl vízben feloldottuk. Az inverz PCR reakciót ezen a templáton végeztük Pry4 és Plw3-1 primerekkel. A PCR reakció körülményei a következők voltak: 1x 3 perc 94 °C/ 35x [30 másodperc 94 °C; 1 perc 55 °C; 2 perc 68°C]/ 1x 10 perc 72 °C. A PCR-terméket Pry4 primert felhasználva közvetlenül szekvenáltattuk.

Reverz transzkripció és PCR

Az RNS-t TRIZOL-os módszerrel tisztítottuk. Ötven darab nőstény legyet cseppfolyós N₂-ben fagyasztottunk, 800 µl TRIZOL-ban (Gibco BRL) homogenizáltunk, majd az elegyet öt percig jégen tartottuk. Az inkubálás után 200 µl kloroformot adtunk hozzá, majd öt percig ismételen jégen tartottuk. A mintát 20 perces centrifugálással 4°C-on ülepitettük, a felülúszót 500 µl izopropanollal kicsaptuk. A totál RNS-t 100 µl eluáló pufferben (100 mM TRIS-HCl pH=7,5; 1 mM EDTA; 0,1% SDS) oldottuk fel. Az mRNS tisztításhoz 100 µl oligotex-dT30-at adtunk az RNS oldathoz, 65°C-on 5 percig inkubáltuk, 20 µl 5M-os NaCl oldatot adtunk hozzá, majd 10 percig 37°C-on tartottuk. Az oligotex- dT30-hoz kötött mRNS-t ülepitettük, majd az mRNS-t 100 µl vízzel eluáltuk és öt percig 65°C-on inkubáltuk. Ismételt ülepités után a felülúszóban lévő mRNS-t 2,5 térfogat etanol: 0,1 térfogat 3M-os Na-acetát elegyével -20 °C-on kicsaptuk, majd ülepitettük és a csapadékot 20 µl vízben feloldottuk. Az mRNS templáton a TimeSaver cDNA Synthesis kittel (Pharmacia) cDNS-t készítettünk, melyet 30 µl-ben 37 °C-on 3 óráig HpaII-vel emésztettünk. Fenol- kloroformos és etanol- Na-acetátos kicsapás után az emésztett cDNS-ekhez 1,5 óráig szobahőn NM1 és NM2 adaptereket ligáltunk, majd a ligázt 10 percig 65 °C-on inaktiváltuk. Az adapterrel ligált HpaII emésztett cDNS-eken az adapterre és a P-elem miniwhite riportergénjére illetve a GFP-re specifikus primerekkel PCR-t végeztünk. A PCR reakció körülményei a következők voltak: 1x 1,5 perc 94 °C/ 30x [45 másodperc 94 °C; 30 másodperc 61 °C; 5 perc 72 °C]. A PCR-termékeket közvetlenül szekvenáltattuk.

Western analízis

A 20 pár kiboncolt petefészkét 150 µl feltáró pufferben (6 mM Tris-Cl pH=6.8, 6.4% glycerol, 2% SDS, 100 mM DTT, 1 mM PMSF, 0.2 mM leupeptin, 15 µM aprotinin és bromophenolkék) szonikálással feltártuk. Körülbelül egy ováriumnak megfelelő petefészkek kivonatát 10%-os SDS-PAGE gélen megfuttattunk. A fehérjéket transzfer oldatban (20% methanol, 25 mM Tris-Cl, 192 mM Glycine) PVDF membránra (Amersham) vittük át. A molekulatömeg jelzésére Bio-Rad Kaleidoscope Prestained Standard-et használtunk. A membránt 16 órán át 5% tejport tartalmazó TTBS oldatban (25mM Tris-Base pH=7,5; 15mM NaCl; 0,1% Tween20) blokkoltuk, majd szobahőn, két óráig 5% tejport tartalmazó TTBS-ben hígított anti-OSK (1:1000), anti-DMOE (1:10000), illetve anti- γ -Tubulin (1:3000, Sigma) ellenanyaggal inkubáltuk. A membránt vízzel és TTBS-el mostuk, majd két óráig 5% tejport tartalmazó TTBS-ben hígított peroxidázzal kapcsolt anti-nyúl másodlagos ellenanyaggal inkubáltuk (Jackson Immuno Research Laboratories). Vizes és TTBS-es mosás után a membránt 15 percig ECL előhívó oldatban tartottuk (10ml 100 mM TRIS pH=8,5 pufferben 25 µl 90 mM kummarinsav, 50 µl 230 mM limunol és 3 µl H₂O₂). A jelet kemilumineszcenciával detektáltuk.

EREDMÉNYEK

Genetikai interakción alapuló mutánsizolálás és a *Rab11* gén jellemzése

Érzékenyített mutáns háttér kialakítása

Célunk a poszterior génhierarchia új tagjainak genetikai interakción alapuló mutagenézissel történő izolálása volt. A genetikai kölcsönhatáson alapuló mutánsizolálást esetünkben az tette lehetővé, hogy a poszterior csoportba tartozó gének különböző mutáns alléljait felhasználva a poszterior póluson lokalizált *osk* mRNS mennyisége különböző mértékben csökkenthető (EPHRUSSI és mtsai. 1991; ERDELYI és mtsai. 1995); (ERDELYI M. és A. EPHRUSSI, személyes közlés). Az *osk* és *TmII* gének mutációival ezért lecsökkenthettük a poszterior póluson lokalizált *osk* mRNS mennyiségét, és az így kialakult poszterior fenotípus domináns enhanszereit izoláltuk, melyeket *Enhancer of TmII and osk* (*E(To)*) mutációknak neveztünk el. Különböző *osk* és *TmII* allélek kombinációit vizsgáltuk meg nem teljes penetranciájú poszterior fenotípus után kutatva. Két olyan allélkombinációt találtunk, amelyet alkalmasnak ítéltünk arra, hogy érzékenyített genetikai háttérként kimutassa domináns enhanszer mutációknak a poszterior fenotípus potroh- és ivarsejthiányos komponenseire kifejtett hatását. A *TmII^{eg9} ca/st osk⁵⁴ TmII^{el4}* allélkombináció nem teljes penetranciájú anyai hatású letalitást okoz, a lerakott peték 66 %-a nem kel ki (1. táblázat). A hibás peték 44%-ában az embriogenezis nem jutott el a kutikulaképzésig, míg a fennmaradó 56%-ban jellegzetes poszterior fenotípusú embriókat találtunk, hiányzó potrohszelvényekkel. Az érzékenyített háttér által okozott poszterior fenotípus 66%-os penetranciája magas expresszivitással párosult. A vad típusú embrióra jellemző nyolc potrohszelvény helyett a *TmII^{eg9} ca/st osk⁵⁴ TmII^{el4}* nőstények utódainak átlagosan csupán 0,69 potrohszelvényük volt (1. táblázat). Ez azt jelenti, hogy a *TmII^{eg9} ca/st osk⁵⁴ TmII^{el4}* érzékenyített háttér hatásosan csökkentette a

poszterior póluson lokalizált *osk* mRNS mennyiségét. Az újonnan indukált mutációk potroghiányos fenotípusát először ezen a genetikai háttéren vizsgáltuk. A második érzékenyített háttér *TmII^{eg9}* és *TmII^{eg20}* alléleket hordozott, és 57%-os penetranciájú ivarsejthiányos fenotípust mutatott (1. táblázat). Mivel a két genetikai háttér hasonló felépítésű, az első genetikai háttéren izolált mutációk könnyen átvihetők a második érzékenyített háttérbe. Ez lehetővé teszi, hogy a potroghiányos fenotípus enhanszereként izolált mutációknak az ivarsejtek kialakulásában játszott szerepét is megvizsgáljuk. Az első genetikai háttérrel izolált E(To) mutációkat ezért bevittük a *TmII^{eg9}/TmII^{eg20}* háttérbe is, és megmértük az ivarsejthiányos fenotípusra kifejtett hatásukat.

Az E(To) mutációk izolálása

Összesen 2625 EMS-sel kezelt második és harmadik kromoszómát hordozó vonalat teszteltünk E(To) mutációra. Az *E(To)/+; TmII^{eg9} ca/st osk⁵⁴ TmII^{el4}* vagy *E(To) TmII^{eg9} ca/st osk⁵⁴ TmII^{el4}* nőstények (ezután teszt nőstény) anyai hatású letális fenotípusát az elpusztult peték arányának megállapításával becsültük meg. Azokat a mutáns vonalakat tartottuk meg, melyekben a teszt nőstények sterilitásának mértéke jelentősen magasabb volt a csak az érzékenyített genetikai háttérrel hordozó nőstények 66%-os penetranciájú steril fenotípusánál. A teszt nőstények utódai homozigóták is lehettek az *E(To)* mutációra, mivel a teszt nőstényeket az első kísérletben technikai okokból nem szűzként gyűjtöttük. Emiatt az *E(To)* mutációk lehetséges embrióletalitása látszólag megemelhette a megfigyelt anyai hatású fenotípus penetranciáját. A teszt nőstények sterilitásának mértékét szűzen gyűjtve is megállapítottuk, hogy a lehetséges zigotikus letalítás hatását kizárjuk. Tizennégy vonalnál erősítettük így meg *E(To)* mutáció jelenlétét (1. táblázat). Ezeket a vonalakat úgy állítottuk törzsbe, hogy a mutagenizált második és harmadik kromoszómát is hordozták.

Az $E(To)$ mutációk az érzékenyített háttéren nem okoztak a potrohhiányos fenotípustól eltérő más kutikulahibát, ami azt jelzi, hogy hatásuk az érzékenyített háttérre specifikus volt. A potrohhiányos fenotípus expresszivitása az $E(To)5$ és az $E(To)12$ vonalak kivételével nem tért el szignifikánsan a kontrolltól, továbbá az $E(To)$ mutációk nem csökkentették szignifikánsan a teszt nőstények peterakó képességét (1. táblázat). Jelenlegi ismereteink alapján nem tudjuk megmagyarázni, hogy egyes $E(To)$ mutációk miért növelték meg teszt nőstények peterakó képességét (1. táblázat).

Az $E(To)$ mutációkat teszteltük a $TmII^{eg9}/TmII^{eg20}$ háttérben is, és az ivarsejthiányos fenotípust az felnőtt utódokban vizsgáltuk. Hét $E(To)$ mutáció ($E(To)1$, $E(To)4$, $E(To)6$, $E(To)10$, $E(To)11$, $E(To)7$ és $E(To)14$) ezen a háttéren is enhanszernek bizonyult, azaz növelte az érzékenyített háttér fenotípusának penetranciáját, jelezve, hogy ezek a mutációk valóban a poszterior génhierarchia tagjait érintik. Az $E(To)12$ és $E(To)13$ mutációk viszont ellentétes hatást gyakoroltak az ivarsejtek fejlődésére: a $TmII^{eg9}/TmII^{eg20}$ háttér ivarsejthiányos fenotípusának nem enhanszerei, hanem szupresszorai voltak: csökkentették a $TmII^{eg9}/TmII^{eg20}$ háttér fenotípusának penetranciáját. Ezeknek a mutációknak a potroh és az ivarsejtek kialakulására kifejtett hatása a *nanos* gén mutációiára emlékeztet (SMITH 1992, DESHPANDE 1999). A *nanos* mutáns nőstények potrohhiányos embrióiban ugyanis több ivarsejt van, mint a vad típusú embriókban. Bár ezek a számfeletti, *nos* null mutáns ivarsejtek az embrionális gonád felé vándorolva elvesznek (KOBAYASHI 1996), lehetségesnek tartjuk, hogy az $E(To)12$ és $E(To)13$ mutációk, bár nem a *nos* génben történtek (lásd később), mégis a *nos*-on keresztül hatnak. Valószínűleg az érzékenyített háttérben az $E(To)12$ és az $E(To)13$ csak részlegesen represszálta a *nos* aktivitást, ami számfeletti ivarsejteket eredményezett, de nem okozott migrációs hibákat. Ugyanakkor az sem zárható ki, hogy az $E(To)12$ és $E(To)13$ mutációk *nos*-tól függetlenül hatnak.

A mutagenézis hatékonyságát egy független kísérletben a vad típusú harmadik kromoszómán indukált recesszív letális mutációk gyakoriságával mértük. Százkét mutagenizált harmadik kromoszómából 34 homozigóta életképes volt. A Poisson-eloszlás alapján így átlagosan 0,99 recesszív letális mutáció esett minden mutagenizált harmadik kromoszómára. Mivel a genetikai interakción alapuló mutánsizolálási kísérletünkben 11 $E(To)$ mutációt és a számítás alapján 2599 egyéb letális mutációt indukáltunk a 2625 mutagenizált harmadik kromoszómán, az $E(To)$ mutációk és a letális mutációk aránya 1:236-hoz.

1. táblázat. Az *E(To)* mutációk jellemzése

<i>E(To)</i> mutáció	Interakció a <i>TmII^{eg9}/osk⁵⁴ TmII^{el4}</i> háttérrel				Interakció a <i>TmII^{eg9}/TmII^{eg20}</i> háttérrel, ivarsejthiányos fenotípus (embriók) (%)	térképhelyzet	homozigóta fenotípus	allélizmus
	nősténysteril fenotípus (peték száma) (%)	szelvény/embrió (embriók száma)	kutikula embriók száma) (%)	nélküli embriók	pete/nap/nőstény			
<i>kontroll</i>	65,6 (932)	0,694 (198)	44,2 (157)		7,6	56,7 (60)		
<i>E(To)1</i>	99,6 (1602)*	0,46 (143)	34,7 (76)		4,2	95,7 (117) *	82A-82B	letális
<i>mago^{E(To)2}</i>	98,1 (53)*	n. a.	n. a.		n. a.	n. a.	57D3-4	steril <i>mago</i>
<i>Rab11^{E(To)3}</i>	98,0 (353)*	0,433 (52)	55,5 (65)		12,6	65,6 (131)	93B6-C3	letális <i>Rab11</i>
<i>E(To)4</i>	96,0 (529)*	0,95 (95)	49,5 (93)		8,8	79,2 (96)*	<i>st-cu</i>	letális
<i>E(To)5</i>	95,2 (102)*	0,90 (35)	61,5 (56) *		9,3	55,0 (152)	<i>ru-h</i>	letális
<i>E(To)6</i>	93,3 (446)*	0,412 (74)	41,7 (53)		5,6	85,3 (129)*	<i>st-cu</i>	letális
<i>osk^{E(To)7}</i>	92,6 (323)*	0,46 (25)	54,5 (30)		10,8	100 (34)*	85C3	steril <i>osk</i>
<i>E(To)8</i>	92,0 (623)*	1,1 (83)	56,3 (107)		14,8	65,1 166)	<i>st-cu</i>	letális
<i>E(To)9</i>	88,3 (519)*	0,429 (106)	26,4 (38)		7,0	43,2 (81)	<i>sr-ca</i>	steril
<i>E(To)10</i>	88,2 (729)*	0,989 (139)	45,3 (115)		11,7	82,2 (152*)	<i>dp-px</i>	letális
<i>Rab11^{E(To)11}</i>	86,7 (635)*	0,487 (119)	41,8 (93)		8,8	81,7 (123)*	93B6-C3	letális <i>Rab11</i>
<i>E(To)12</i>	86,0 (897)*	0,642 (70)	59,1 (101) *		11,5	31,7 (109)*	<i>cu-ca</i>	letális
<i>E(To)13</i>	84,7 (727)*	0,811 (61)	43,0 (46)		9,6	34,1 (138)*	3. kr.	letális
<i>vasa^{E(To)14}</i>	83,4 (1118)*	0,504 (124)	44,0 (100)		10,8	88,3 (145)*	35B10-C1	steril <i>vasa</i>

A szignifikáns eltérés a kontrolltól *-al jelöltük. (χ^2 -próba, $P < 0.05$).

Az *E(To)* mutációk komplementációs analízise

Komplementációs vizsgálattal állapítottuk meg, hogy az izolált *E(To)* mutációk hány gént érintenek. Ehhez az *E(To)* mutációkat hordozó törzseket páronként kereszteztük egymással. A komplementációs analízis megmutatta, hogy az *E(To)* mutációk többsége komplementálta egymást. A 91 transz-heterozigóta kombinációból csupán három nem komplementáló párt találtunk. Az *E(To)3 /E(To)11* transz-heterozigóták letálisak voltak, bizonyítva, hogy ez a két mutáció allélikus (1. táblázat). Az *E(To)7 /E(To)1* és az *E(To)7 /E(To)14* nem komplementáló párok természete azonban más volt. A transz-heterozigóta nőstények mindkét esetben sterilek voltak, petéikben potroghiányos embriók fejlődtek. Az *E(To)14 /E(To)1* transz-heterozigóta nőstények azonban teljesen fertilisek voltak, valószínűsítve, hogy az *E(To)14*, *E(To)7* és az *E(To)1* mutációk nem allélikusak. Az *E(To)14 /E(To)1* és az *E(To)7 /E(To)14* nem komplementáló párok sterilizációját feltehetőleg nem allélizmus, hanem domináns interakció okozza. A komplementációs analízisben ugyanis a transz-heterozigóták homozigóták voltak a *TmII^{eg9}* mutációra, ami egy gyenge érzékenyített genetikai hátteret eredményezett. Ez a háttér felerősítette az *E(To)* mutációk közötti gyenge genetikai interakciót, így az láthatóvá vált. Az *E(To)* mutációkat ismert poszterior gének mutációival is komplementáltattuk (Anyagok és módszerek). Ez a komplementációs analízis megerősítette, hogy az *E(To)14*, *E(To)7* és az *E(To)1* mutációk valóban nem allélikusak. Az *E(To)14* egy *vasa* allélnek, az *E(To)7* egy *osk* allélnek bizonyult, míg *E(To)1* komplementálta az *osk* és a *vasa* alléleket is. Az ismert poszterior gének mutációival végzett komplementációs analízis megmutatta, hogy az *E(To)2* mutáció a *mago nashi* gén egy új allélja. Összegezve: komplementációs analízissel bizonyítottuk, hogy a 14 *E(To)* mutáció 13 gént azonosít, melyek közül három *E(To)* mutáció ismert

poszterior gén új allélja, 11 $E(To)$ mutáció pedig a poszterior génhierarchia 10 új tagját azonosítja.

Az $E(To)$ mutációk térképezése

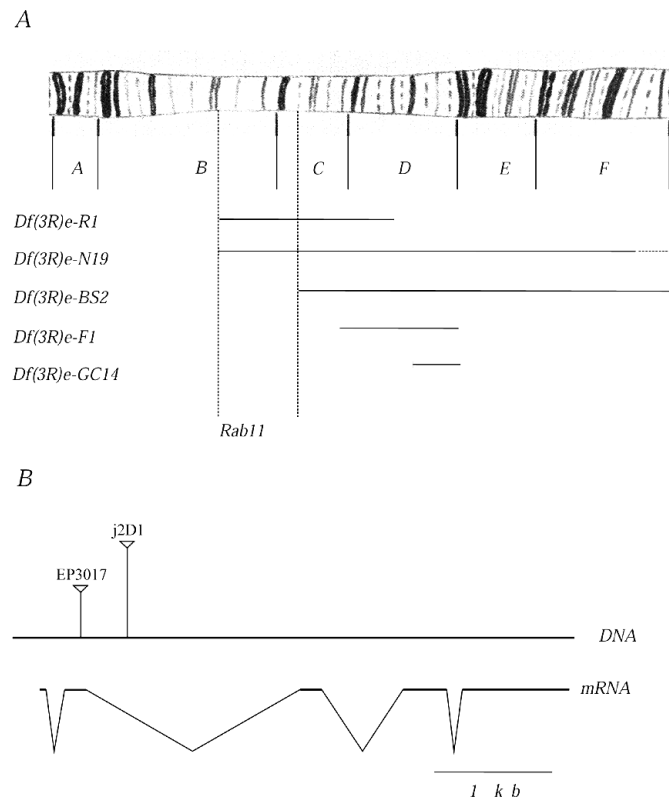
A mutagenizált második és harmadik kromoszómákat együtt hordozó vonalakban a kromoszómákat szegregáltattuk, és minden mutáns vonal esetében csak a mutagenizált harmadik, vagy csak a mutagenizált második kromoszómát hordozó alvonalakat hoztunk létre. Ezeket az alvonalakat teszteltük letális, nősténysteril és anyai hatású ivarsejthiányos fenotípusra. Összesen 13 letális és négy nősténysteril mutációt találtunk. Ivarsejthiányos mutációt nem azonosítottunk. A 14 eredeti mutáns törzsből az $E(To)2$, $E(To)3$ és az $E(To)11$ esetében találtunk letális vagy nősténysteril mutációt mindkét autoszómán. Az alvonalak mutagenizált kromoszómáit ismét bevittük az érzékenyített genetikai háttérre, hogy megállapítsuk, melyik autoszóma hordozza az interakcióért felelős $E(To)$ mutációt. A teszt-nőstények fenotípusának vizsgálatával az $E(To)$ mutációt 11 mutáns vonalban a harmadik kromoszómára, három vonalban a második kromoszómára térképeztük (1. táblázat).

A szegregáltatott mutagenizált kromoszómákon az $E(To)$ mutációkat meiótikus rekombinációval térképeztük. Tizenegy $E(To)$ kromoszóma csupán egy letális vagy nősténysteril mutációt hordozott. Ezeket a mutációkat a térképező kromoszóma marker-mutációi közé térképeztük (1. táblázat). A mutagenézis hatékonyságának statisztikai analízise kimutatta, hogy a mutagenézis során átlagosan egy recesszív letális mutációt indukáltunk kromoszómánként. A statisztikai analízis szerint számos olyan kromoszóma van azonban, melyen több mint egy új mutációt indukáltunk. A Poisson-eloszlás szerint ilyen mutagenézis-hatékonyság mellett a mutagenizált kromoszómák

33%-a hordozhat két letális mutációt. Ennek megfelelően a 11 harmadik kromoszómás vonalból három $E(To)$ kromoszóma ($E(To)1$, $E(To)4$ és $E(To)12$) két letális mutációt hordozott. Az $E(To)$ aktivitás mutációhoz rendeléséhez ezekből a vonalakból ismét alvonalakat hoztunk létre, melyek csak az egyik, vagy csak a másik letális mutációt hordozták. A rekombináns kromoszómákat ismét rávittük az első érzékenyített genetikai háttérre, és vizsgáltuk az $E(To)$ aktivitás meglétét. Ezzel a módszerrel az $E(To)1$ és az $E(To)4$ vonalban az $E(To)$ aktivitásért felelős mutációt a *st-cu* kromoszómarégióba térképeztük. Az $E(To)12$ kromoszómán az *cu-ca* régióba eső mutáció volt felelős az enhanszer hatásért. Az $E(To)13$ vonal kivételével sikerült létrehozunk "tisztá" $E(To)$ vonalakat, melyek mentesek voltak a $TmII^{eg9}$, illetve a second-site mutációktól is, és csak az $E(To)$ aktivitásért felelős mutációt hordozták. Ezekkel a "tisztá" $E(To)$ kromoszómákkal végeztük a további vizsgálatokat.

Az $E(To)$ mutációk vizsgálatának következő lépéseként pontosabban térképeztük az érzékenyített háttérrel legerősebb genetikai interakciót mutató $E(To)1$ mutációt, és az egyetlen többtagú komplementációs csoport egyik tagját, az $E(To)11$ -et. Mindkét mutációt sikerült deléciós térképezéssel egy szűk kromoszómaszakaszra lokalizálni. Az $E(To)1$ mutáció a *st* és a *cu* markerek közé térképeződött. Az ebben a régióban található deléciókkal komplementáltattuk az $E(To)1$ mutációt, és megállapítottuk, hogy a $Df(3R)Z1$ és a $Df(3R)2-2$ deléciók nem komplementálták az $E(To)1$ letális fenotípusát. A $Df(3R)Z1$ régióba térképezett kisebb méretű deléciók közül a $Df(3R)XM3$ és a $Df(3R)110$ komplementálták az $E(To)1$ letálítását. Ezek alapján az $E(To)1$ mutációt sikerült a harmadik kromoszóma 82A-82B régiójába térképezni (1. táblázat). Az $E(To)11$ mutáció a *sr* térképező markertől disztálisan helyezkedett el. Az ennek megfelelő kromoszómaszakaszt lefedő deléciókkal

komplementációs analízist végeztünk, és megállapítottuk, hogy a *Df(3R)e-R1* és a *Df(3R)e-N19* deléciók nem komplementálják, a *Df(3R)e-BS2*, *Df(3R)e-F1* és a *Df(3R)e-GC14* deléciók komplementálják az *E(To)11* letalitását. Ezek alapján az *E(To)11* mutációt sikerült a 93B6-C3 régióba térképezni (7. ábra).



7. ábra A *Rab11* gén citológiai helyzete és genomikus szerkezete. A, A 93-as régió citológiai térképe. A vízszintes vonalak a deletált régiókat jelölik. A függőleges pontozott vonalak a *Rab11* gént tartalmazó kromoszómaszakaszt jelzik. **B,** A *Rab11* gén sematikus szerkezete. A háromszögek a *Rab11^{j2D1}* és a *Rab11^{EP3017}* P-elemek beépülésének helyét jelzik.

Homozigóta *E(To)* fenotípusok

A *TmII^{eg9}* és a second-site mutációktól megtisztított mutagenizált második és harmadik kromoszómákat használtuk a homozigóta *E(To)* fenotípusok vizsgálatához. Tíz vonalban az *E(To)* mutáció letális volt, négy vonalban pedig nősténysterilitást eredményezett. Mint már korábban említettük, a négy steril vonalból három az *osk*, a

vasa illetve a *mago* gének alléljai voltak. A negyedik steril mutáció, az *E(To)9*, látható fenotípust is okozott. Az *E(To)9* homozigótáknak rögzös szemeik, és csipkézett szárnyszéleik voltak. A steril *E(To)9* homozigóta nőstények petéinek dorzális függeléke kissé rövidebb volt a vad típusétól. A csökevényes dorzális függelék a helyes *osk* mRNS lokalizációhoz szükséges grk-DER szignálút hibájára utalhat. Az *E(To)9* homozigóta nőstények petéinek dorzális függeléke azonban, a grk-DER hibás petéikkel ellentétben, nem tolódott el poszterior irányba. *In situ* mRNS hibridizációval kimutattuk, hogy az *E(To)9* homozigóta petekamrákban a *grk* és az *osk* mRNS-ek jól lokalizálódnak. Ezek alapján az *E(To)9* mutáció a poláris plazma kialakulásának folyamatában a *grk* szignál és az *osk* mRNS lokalizáció után hat.

Az *E(To)3* és az *E(To)11* mutációk a *Rab11* gén alléljai

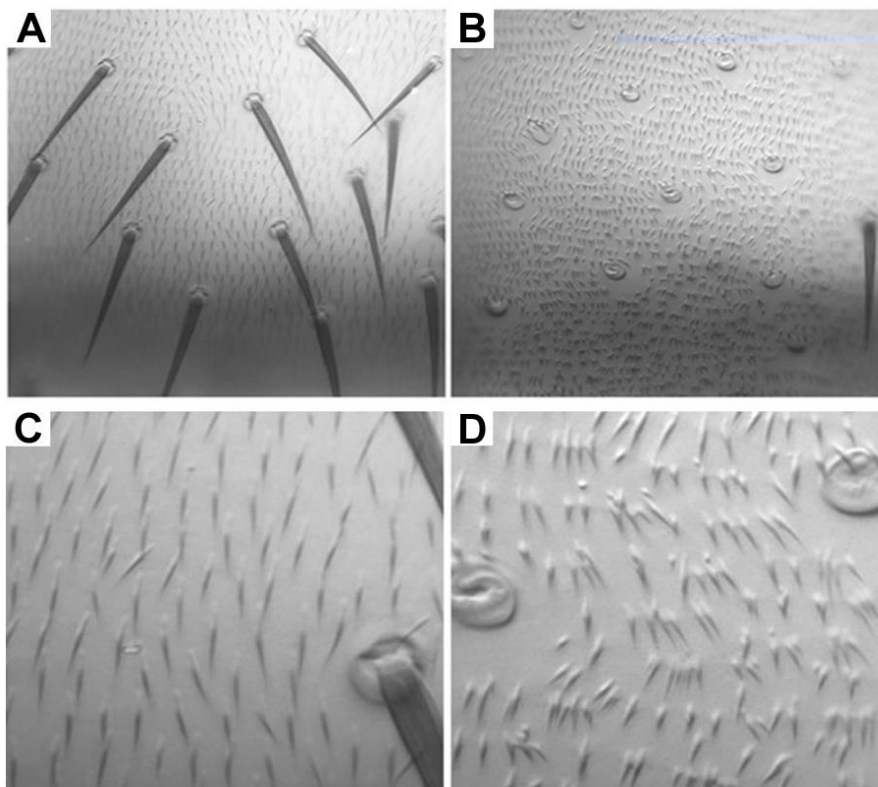
Az *E(To)3* és az *E(To)11* mutációk az egyedüli többtagú komplementációs csoportot képviselik mutánsgyűjteményünkben. Az *E(To)11* mutációt recesszív letalitás alapján a 93B6-C3 régióba térképeztük. Komplementációs analízist végeztünk az *E(To)11* és az *E(To)3* allélek, illetve az ebben a régióban található gének alléljai között. Két nem komplementáló P-elem inszerciós mutánst találtunk, az *l(3)j2D1*-et és az *EP(3)3017*-et. Mindkét P-elem inszerció a citoplazmatikus membránszállításhoz szükséges kis GTP-ázt kódoló *Rab11* génben történt (7. ábra). Ezen kívül azt találtuk, hogy az *l(3)93Bi* (EISENBERG és mtsai. 1990), egy szemilevális EMS-indukált mutáció, sem komplementálta az *E(To)11* és az *E(To)3* mutációkat. A *Rab11* komplementációs csoportot így tehát három új taggal bővítettük. Az öt *Rab11* allél komplementációs viselkedését az 2. táblázat mutatja.

2. táblázat. A *Rab11* allélok komplementációs analízise

	<i>93Bi</i>	<i>j2D1</i>	<i>EP3017</i>	<i>E(To)11</i>	<i>E(To)3</i>	<i>Df(3R)e-N19</i>
<i>93Bi</i>	életképes, gyenge szőrhibák, fertilis	életképes, gyenge szőrhibák, szemisteril ^a	életképes, erős szőrhibák, steril	életképes, erős szőrhibák, steril	életképes, erős szőrhibák, steril	letális
<i>j2D1</i>		letális	letális	letális	letális	letális
<i>EP3017</i>			letális	letális	letális	letális
<i>E(To)11</i>				letális	letális	letális
<i>E(To)3</i>					letális	letális
<i>Df(3R)e-N19</i>						letális

^a A *Rab11*^{93Bi}/*Rab11*^{j2D1} nőstények sterilitása nem teljes. A lerakott peték nyolc százaléka lárvává fejlődött. A kikelt felnőttek két százaléka ivarsejthiányos fenotípust mutatott.

A *Rab11*^{93Bi} transz-heterozigóták kivételével minden heteroallélikus *Rab11* kombináció letális volt. A *Rab11*^{93Bi} kombinációk életképesek voltak, és a transzheterozigóták szemiletalitással kapcsolt szőrfenotípust mutattak. A szőrfenotípus expresszivitása alapján a *Rab11* alléljeinket erősség szerint sorba állítottuk (2. táblázat). A szőrhibák a makrochéták enyhe megrövidülésétől a makrochéták teljes hiányáig váltakoztak (8. ábra). Mivel a kosársejt (socket) és a nyélsejt (shaft) helyesen kialakul, úgy gondoljuk, hogy a *Rab11* nem a külső érzékszervek sejtjeinek a leszármazásának szabályozásában vesz részt, hanem specifikusan a szőr növekedéséhez szükséges. A szőrfenotípus nem korlátozódott a makrochétákra, a tergiteken található tricomák is abnormálisak voltak. A normális, szőrsejtenkénti egy rövid szőr helyett, kettő-öt rövid szőrt találtunk egy csomóban (8. ábra).



8. ábra A *Rab11* mutánsok szőrfenotípusa. **A,** Vad típusú hím negyedik tergijének makrochétái. **B,** A *Rab11^{E(To)11}/Rab11^{EP3017}* hím negyedik tergijének részlete. A makrochéták megrövidültek vagy teljesen hiányoznak. **C,** Vad típusú hím negyedik tergijének rövid szőrei. **D,** A *Rab11^{E(To)11}/Rab11^{EP3017}* hím rövid szőrei abnormális morfológiájúak.

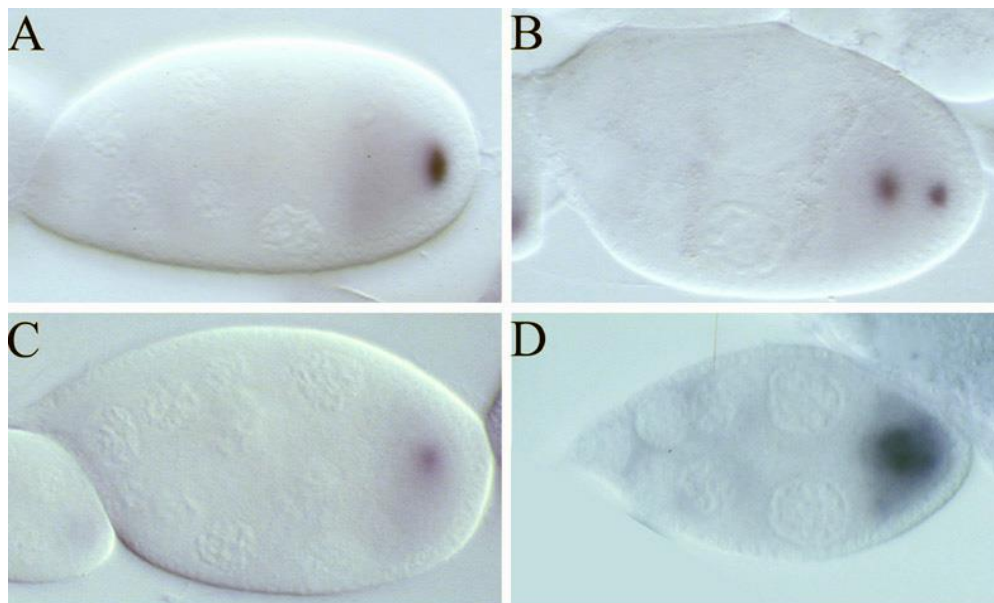
A szemiletalitás és a szőrhibák mellett az életképes *Rab11* allélkombinációk nőtényszerilek voltak (2. táblázat). A *Rab11^{j2D1}/Rab11^{93Bi}* transzheterozigóta kombináció mutatta a leggyengébb szemisteril fenotípust. Az ilyen genotípusú nőtények lerakott petéinek 7,7%-a lárvává fejlődött. A túlélő utódok 2%-a ivarsejthiányos fenotípusú volt, ami a poszterior génhierarchia számos tagjának gyenge alléljaira jellemző. A *Rab11^{j2D1}/Rab11^{93Bi}* nőtények peterakó képessége vad típusú volt. A *Rab11^{EP3017}/Rab11^{93Bi}* és a *Rab11^{E(To)11}/Rab11^{93Bi}* allélkombináció erősebb fenotípust eredményezett. Ezek a nőtények teljesen sterilek voltak, kevesebb petét raktak, mint a vad típusú állatok. Petéik korionjának mintázata halvány volt, dorzális függelékeik rövidebbek voltak és a peték gyakran összeestek. A transzheterozigóta

steril fenotípus alapján a *Rab11* alléleket allélerősség szerint a következő sorrendbe állítottuk: $93Bi < j2D1 < EP3017 = E(To)11 = E(To)3 < Df$. Ez a sorrend megegyezik a szőrfenotípus erőssége alapján felállítottal (2. táblázat).

Annak vizsgálatához, hogy a *Rab11* mutációk E(To) hatása specifikus-e, a *Rab11^{j2D1}*, *Rab11^{93Bi}* és a *Rab11^{EP3017}* alléleket is bevittük az érzékenyített genetikai hátterekbe. Habár ezeket az alléleket különböző mutánsizolálási kísérletekben állították elő, mind E(To) mutációként viselkedtek, és domináns enhanszerei voltak az érzékenyített hátterek okozta fenotípus penetranciájának.

A *Rab11* gén szükséges az *osk* mRNS lokalizációjához

Mivel a két *Rab11^{E(To)}* allélt egy *osk*-hiányos genetikai háttér domináns enhanszereként izoláltuk, megvizsgáltuk az *osk* mRNS eloszlását az életképes heteroallélikus kombinációkban (9. ábra). A *Rab11^{EP3017}/Rab11^{93Bi}*, *Rab11^{j2D1}/Rab11^{93Bi}*, *Rab11^{j2D1}/Rab11^{E(To)11}* mutáns petekamrákban az *osk* mRNS jól lokalizálódott a peteérés nyolcadik stádiumáig. A kilencedik stádiumban azonban átmenetileg hibás *osk* mRNS lokalizációt figyeltünk meg. A vad típusra jellemző szoros poszterior lokalizáció helyett három különböző típusú abnormális *osk* mRNS lokalizációt találtunk a mutáns petekamrákban. I. A mutáns petekamrákban gyakran találtunk gyenge *osk* mRNS delokalizációt, amikor a petesejtben a normális poszterior lokalizációval egyidejűleg az *osk* mRNS a petesejt közepén is megfigyelhető volt. II. Az *osk* mRNS gyakran lokalizálódott ektopikusan a petesejt közepén. III. A legkomolyabb eltérést a vad típustól az *osk* mRNS pontszerűen szétszórt, legtöbbször a poszterior pólus közelében történő lokalizációja volt (9. ábra, 3. táblázat).



9. ábra *In situ osk* mRNS hibridizáció. A, Poszterior *osk* mRNS lokalizáció a 9. stádiumú, vad típusú petesejtben. B-D, Az *osk* mRNS eloszlása a *Rab11^{93Bi}/Rab11^{j2D1}* mutáns petesejtekben. Az *osk* mRNS részlegesen (B), vagy teljesen a petesejt közepén (C), vagy szétszórt mintázatban lokalizálódott (D).

A *Rab11* hatása az *osk* mRNS lokalizációjára ivarsejtfüggő

Mivel az *osk* mRNS lokalizációjához a petesejt és a poszterior follikuláris sejtek normális működése egyaránt szükséges, megvizsgáltuk, hogy a *Rab11* mutációk fókusza az ivarvonalon, vagy a petesejtet körülvevő szomatikus follikuláris sejtekben van-e. *Rab11* homozigóta ivarsejtvonal-klónokat az ovoD-FRT módszerrel indukáltunk és megvizsgáltuk bennük az *osk* mRNS lokalizációját (CHOU és PERRIMON 1996). A közepesen erős *Rab11^{j2D1}* allélre homozigóta ivarsejtvonal-klónokban a *Rab11* heterozigótákra jellemző hibás *osk* mRNS lokalizációt találtunk. Az *ovoD* mentes petesejtekben ugyanazt a három lokalizációs hibát tudtuk kimutatni, amit a *Rab11* heterozigótákban (3. táblázat).

3. táblázat. Az *osk* mRNS hibás lokalizációja a 9. stádiumú petekamrákban

genotípus	petekamrák száma	poszterior lokalizáció	hibás lokalizáció		
			középső és poszterior	közép	poszterior mintázatos
<i>kontroll</i>	152	100	0	0	0
<i>Rab11^{j2D1}/Rab11^{93B}_i</i>	110	59,1	9,1	22,7	9,1
<i>Rab11^{EP3017}/Rab11_{93Bi}</i>	71	73,2	4,2	7,0	15,5
<i>Rab11^{E(To)11}/Rab11_{93Bi}</i>	50	60,0	10,0	8,0	22,0
<i>Rab11^{j2d1}</i> ivarvonalklón	75	38,7	14,7	8,0	38,7

A *Rab11^{j2D1}* ivarvonalklónokból azonban nem fejlődtek életképes lárvák, ami azt jelzi, hogy a *Rab11* génnek pleiotróp funkciója van a petefejlődésben. Az erős mutánsok (*Rab11^{EP3017}* és *Rab11^{E(To)11}*) ivarvonalklónjaiban soha nem találtunk negyedik stádiumnál idősebb petekamrát. Mivel az *ovoD* domináns-szelektív marker a negyedik stádiumban állítja le a petekamrák fejlődését, a negyedik stádiumnál idősebb petekamrák hiánya azt jelzi, hogy a *Rab11* génre a korai ivarsejtfejlődésben is szükség van.

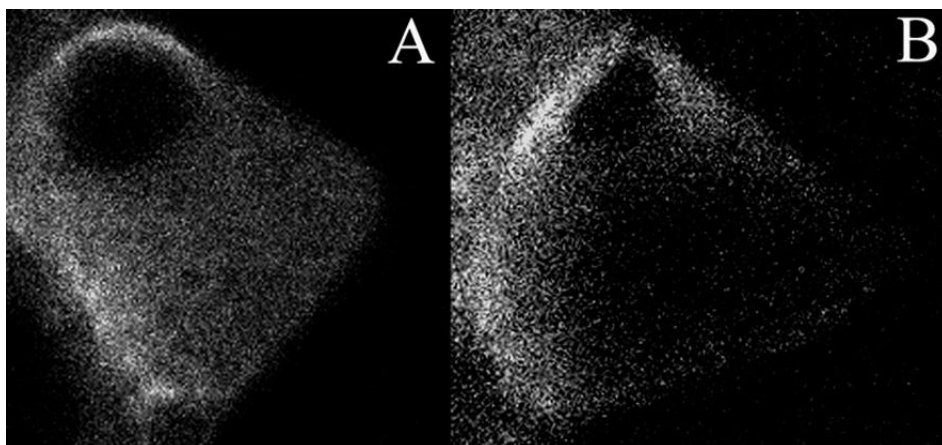


10. ábra β -Galaktozidáz festés. **A,** Poszterior Kin: β -Gal lokalizáció a 9. stádiumú, vad típusú petesejtben. **B,** Kin: β -Gal lokalizáció a 9. stádiumú, *Rab11^{93Bi}/Rab11^{EP3017}* petesejt közepén.

A *Rab11* szükséges a petesejt sejtvázáinak működéséhez

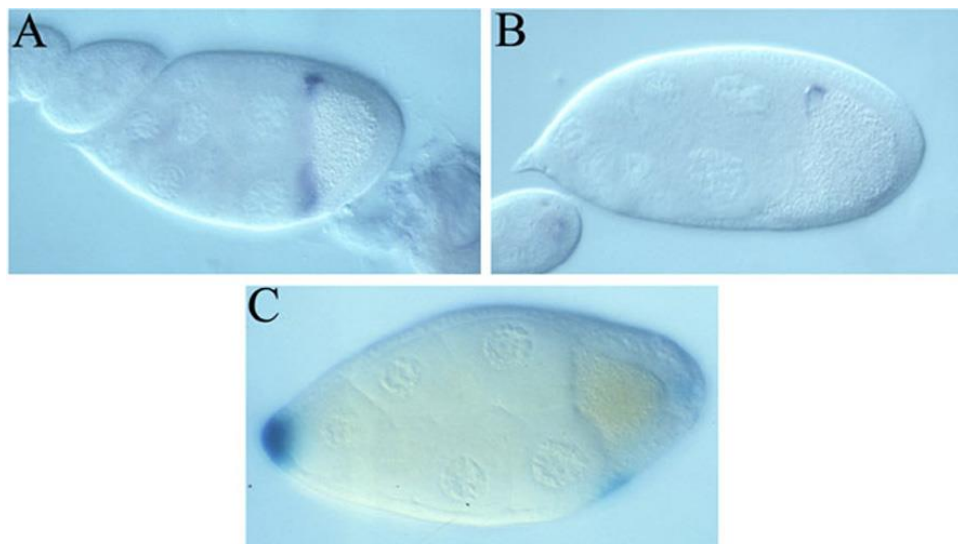
Számos mutánsban (*Notch*, *Delta*, *grk*, *PKA* és *lamininA*, *Merlin*) megfigyelték azt a sajátos *osk* mRNS lokalizációs hibát, hogy az *osk* mRNS a petesejt közepén helyezkedik el (DENG és RUOHOLA-BAKER 2000; GONZALEZ-REYES és mtsai. 1995; LANE és KALDERON 1994; MACDOUGALL és mtsai. 2001; ROTH és mtsai. 1995; RUOHOLA és mtsai. 1991). Ezeknek a mutációknak a részletes vizsgálata kimutatta, hogy a petesejt sejtvázáinak átalakulásához szükséges petesejt-follikuláris sejt kommunikációra hatnak. A hibás kommunikáció miatt az eredetileg a petesejt poszterior pólusán található MTOC nem bomlik fel, míg az anterior póluson az új MTOC - csakúgy mint a vad típusban - kialakul. Így a petesejtben egy két MTOC-t tartalmazó szimmetrikus mikrotubulus-váz alakul ki, ami az *osk* mRNS-t a petesejt közepére, míg *bcd* mRNS-t az anterior és a poszterior pólusra is irányítja. A mutáns petesejtekben a Kinesin: β -galaktozidáz fúziós fehérje, ami a mikrotubulusok pozitív végét jelzi, az *osk* mRNS-hez hasonlóan a petesejt közepén lokalizálódik (CLARK és mtsai. 1994; GONZALEZ-REYES és mtsai. 1995; ROTH és mtsai. 1995). Ilyen szimmetrikus mikrotubulus-vázzal rendelkező petesejtben a sejtmag nem jut el az antero-dorzális sarokba, és a mag a poszterior póluson marad (GONZALEZ-REYES és

mtsai. 1995; ROTH és mtsai. 1995). A *Rab11^{93Bi}/Rab11^{EP3017}* mutáns petesejtekben is középen lokalizált Kin:β-Gal felhalmozódást figyeltünk meg (10. ábra). A mikrotubulusok közvetlen megjelenítésével (MICKLEM és mtsai. 1997) azonban megmutattuk, hogy a *Rab11* mutációk, a *Notch*, *PKA* és a *lamininA* mutációktól eltérően, soha nem eredményeznek szimmetrikus mikrotubulus vázat. A Tau mikrotubulus-kötő és a GFP fluoreszcens fehérje fúziójával kialakított Tau:GFP soha nem akkumulálódott a nyolcadik stádiumú *Rab11^{93Bi}/Rab11^{j2D1}* mutáns petesejtek poszterior pólusán (11. ábra). Ez azt jelzi, hogy a kilencedik stádiumra a poszterior MTOC normálisan lebomlott. Ezzel összhangban a *Rab11* mutáns petesejtekben a vad típushoz hasonlóan a *bcd* mRNS a petesejt anterior pólusán a *grk* mRNS pedig a petesejt anterodorzális sarkában lokalizálódott (12. ábra) A *Rab11* mutáns petesejtekben a sejtmag mozgása a poszterior pólusról az anterodorzális sarokba mindig vad típusú volt. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy a follikuláris sejtekből a petesejthez érkező és a mikrotubulusok átrendeződését eredményező szignálra nincs hatással a *Rab11* gén.



11. ábra Tau:GFP fluoreszcenciájának konfokális vizsgálata. A, Tau:GFP fluoreszcenciája vad típusú, 8. stádiumú petesejtben. B, Tau:GFP fluoreszcenciája 8. stádiumú, *Rab11^{93Bi}/Rab11^{j2D1}* petesejtben.

A petesejtből a follikuláris sejtekhez küldött szignál is érintetlen a *Rab11* mutánsokban. A vad típusú petekamrákban a petesejt a *grk* gén által kódolt jelet küld a petekamra poszterior részén található poláris follikuláris sejteknek, melyek ennek hatására poszterior poláris follikuláris sejtté differenciálódnak (GONZALEZ-REYES és mtsai. 1995). A *grk* mutánsokban a szignál hiánya miatt a poszterior póluson található poláris follikuláris sejtek anterior poláris follikuláris sejtekké differenciálódnak és kifejezik az anterior poláris follikuláris sejtekre specifikus *slbo*^l enhanszer-csapda markert (GONZALEZ-REYES és mtsai. 1995). A *Rab11*^{93Bi}/*Rab11*^{EP3017} és a *Rab11*^{93Bi}/*Rab11*^{E(To)11} mutáns kilencedik stádiumú petekamrákban azonban csak a normális anterior *slbo*^l kifejeződést tudtuk megfigyelni (12. ábra). Ez azt mutatja, hogy a *Rab11* nem szükséges sem a *grk* mediált szignál kijutásához a petesejtből, sem pedig a follikuláris sejtek differenciálódásához.



12.ábra *In situ* *grk* és *bcd* mRNS hibridizáció és β -Galaktozidáz festés. A,B, *In situ* mRNS hibridizáció. A *bcd* mRNS az anterior póluson (A), a *grk* mRNS az anterodorzális sarokban (B) lokalizálódik a *Rab11*^{93Bi}/*Rab11*^{J2D1} petesejtben. C, Az *slbo*^l enhanszer-csapda marker β -Gal festése a bordersejtekben *Rab11*^{93Bi}/*Rab11*^{J2D1} petekamrákban.

A *Rab11* mutáns petesejtek mikrotubulus-vázának közvetlen megjelenítése Tau:GFP segítségével azonban jelentős különbséget tárt fel a vad típushoz képest. A vad típusú anterior- poszterior irányú grádiens helyett kortikális Tau:GFP felhalmozódást figyeltünk meg a nyolcadik stádiumú petesejtekben (11. ábra).

A *Rab11* mutáns fenotípusok jelentősen különböznek a petesejt és a follikuláris sejtek kölcsönös kommunikációját befolyásoló mutánsokétól. A *Rab11* mutációk hatása a mikrotubulus organizációra és az *osk* mRNS lokalizációjára leginkább a *par1* gén mutációinak hatására emlékeztet (SHULMAN és mtsai. 2000; TOMANCAK és mtsai. 2000). A *par1* egy poszterior póluson lokalizált kináz, amely az antero-poszterior polarizációnak egy olyan új lépését befolyásolja, ami szükséges az *osk* mRNS lokalizációjához, de nem szükséges a *bcd* mRNS lokalizációjához (SHULMAN és mtsai. 2000).

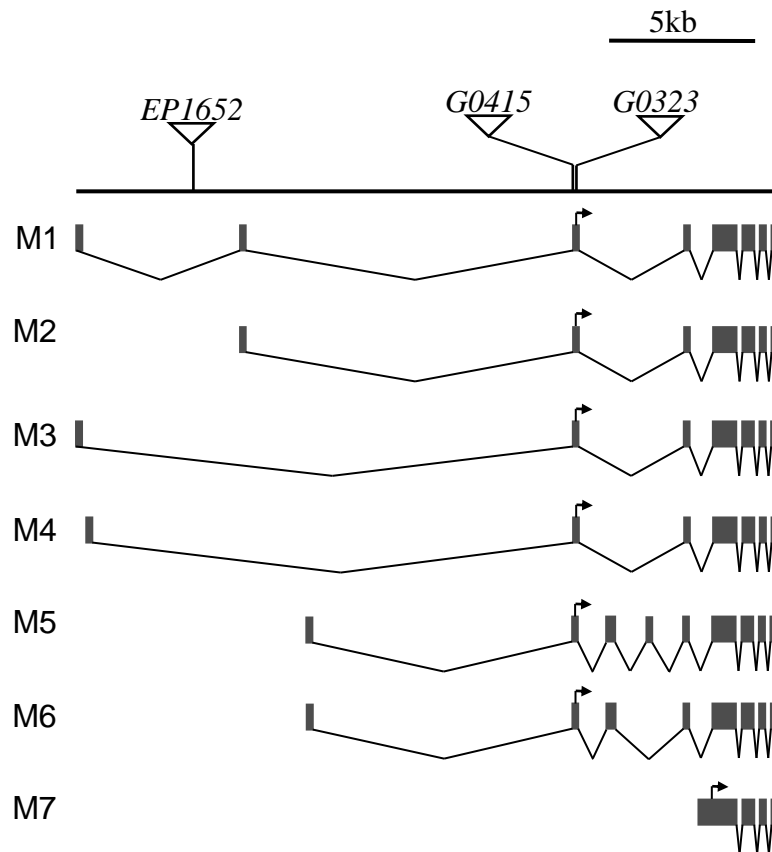
Géncsapda elven alapuló P- elemes mutánsizolálás

Géncsapda elven alapuló P-elemes mutánsizolálás

1410 P-elem mobilizációs keresztezés eredményeként 180 új inszerciós mutánst állítottunk elő. A P-elem beépülések közül 112 az X-kromoszómán 68 pedig az autoszómákon történt. Az autoszómás inszerciók között 26 letális és három steril volt, 39 inszerció nem okozott fenotípust. Az X-kromoszómán 104 fenotípus nélküli, négy steril (*GT176*, *GT217*, *GT115*, *GT87*), két részlegesen ivarsejthiányos (*GT193*, *GT229*), egy nőstényletális (*GT57*) és egy látható szárnyfenotípust (*GT231*) okozó inszerciót izoláltunk. A géncsapda inszerciók közül a *GT193* mutáns részletes vizsgálatát végeztük el.

A *GT193* mutáció a *Dmoe* gén allélja

A *GT193* mutációt fúziós mRNS-ről kiinduló adapteres RT-PCR-el klónoztuk. Számítógépes szekvencia-vizsgálattal megállapítottuk, hogy a *GT193* mutánsban a P-elem inszerciója a *Dmoe* gén egyik intronjában történt. A *Dmoe* a ERM-fehérjecsaldba tartozik, melyet az emlősökben három közeli rokon fehérje, az *Ezrin*, *Radixin* és a *Moesin* alkot (BRETSCHER 1999; BRETSCHER és mtsai. 2000; LOUVET-VALLEE 2000; TSUKITA és YONEMURA 1999). A muslicagenom szekvenálása megmutatta, hogy a *Drosophilában* az ERM családnak csak egy tagja, a *Drosophila moesin* fordul elő (ADAMS és mtsai. 2000). A Moesin C-terminális részén található a FERM domén, mely lehetővé teszi a Moesin kapcsolódását számos membránfehérjéhez (CHISHTI és mtsai. 1998). A fehérje N-terminálisán egy aktinkötő domén található. A Moesinben előforduló domének alapján a Moesint az aktinváz és a sejthártya keresztkötéséért felelős fehérjének tartják. A *Dmoe* gén az X kromoszóma 8B4 citológiai régiójában található. Inverz PCR és számítógépes adatbázisok analízise segítségével meghatároztuk az ebben a citológiai régióban található P-elem inszerciók pontos helyét. A *Dmoe*^{G0415}, *Dmoe*^{G0404}, *Dmoe*^{G0067}, *Dmoe*^{EP1371} és a *Dmoe*^{EP1652} inszerciók a *Dmoe* gén egyik intronját, a *Dmoe*^{G0323} inszerció a *Dmoe* gén egyik exonját érintették (13. ábra). A számítógépes adatbázisok vizsgálata megmutatta, hogy a *Dmoe* génen alternatív promóterhasználattal és alternatív splicing révén hét különböző mRNS keletkezhet, melyekről négy fehérje izoforma képződhet. A gén szerkezetét a 13. ábra mutatja.



13. ábra A *Dmoe* gén szerkezete. A háromszögek a P-elemek beépülésének helyét jelölik, a szürke négyzetek exonokat jelentenek. A meghajlított vonalak az M1-M7 mRNS változatokat jelölik, a transzlációs kezdőpontokat nyilak jelzik. A *Dmoe*^{G0404}, *Dmoe*^{G0067} és a *Dmoe*^{GT193} P-elemek nincsenek feltüntetve, mert beépülési helyük megegyezett a *Dmoe*^{G0415}-ével (174360 bp az AE003445 kontigon). A *Dmoe*^{G0323} inszerciós helye 174340 bp, a *Dmoe*^{EP1652} beépülési helye 176762 bp az AE003445 genomális DNS szekvencia kontigban.

A *GT193* allél komplementációs analízise

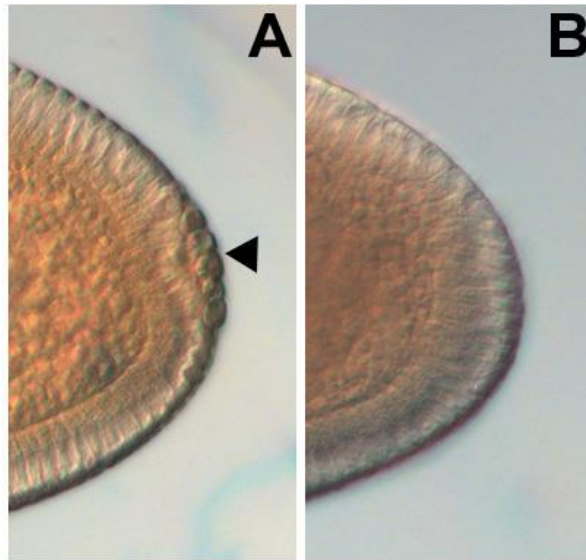
A *GT193* mutáció homozigóta formában nagyon alacsony penetranciájú ivarsejthiányos fenotípust okozott. Mivel a *Dmoe* gén az X kromoszóma 8B4 régiójában található, komplementációs vizsgálatot végeztünk az ebbe a kromoszómarészbe térképezett mutációkkal. Ezzel a módszerrel öt nem komplementáló P-elem inszerciós mutánst találtunk. A *Dmoe* génben található *Dmoe*^{G0415}, *Dmoe*^{G0404}, *Dmoe*^{G0067}, *Dmoe*^{G0323} és a *Dmoe*^{EP1652} mutációk, illetve a *Df(1)KA14* deléció nem komplementálták a *GT193* ivarsejthiányos fenotípusát (4. táblázat).

4. táblázat. A *Dmoe* allélok komplementációs analízise

<i>allél^a</i>	<i>GT193</i>	<i>EP1652</i>	<i>G0415</i>	<i>G0323</i>	<i>Df(1)KA14</i>
<i>GT193</i>	≈1% ivarsejthiányos (50)	≈1% ivarsejthiányos (35)	≈1% ivarsejthiányos (79)	≈1% ivarsejthiányos (46)	7% ivarsejthiányos (93)
<i>EP1652</i>		13% ivarsejthiányos (56)	97% steril (331) 60% ivarsejthiányos (25)	98% steril (250) 28% ivarsejthiányos (28)	97% steril (117) 61% ivarsejthiányos (23)
<i>G0415</i>			100% steril, kevés petét rak, abnormális szárny és szem	100% steril, kevés petét rak, abnormális szárny és szem	letális
<i>G0323</i>				letális	letális
<i>Df(1)KA14</i>					letális

^aMivel a *G0404*, *G0067* és a *G0415* P-elem inszerciók beépülési helye és fenotípusa megegyezik, a táblázatban csak a *G0415* allél van feltüntetve.

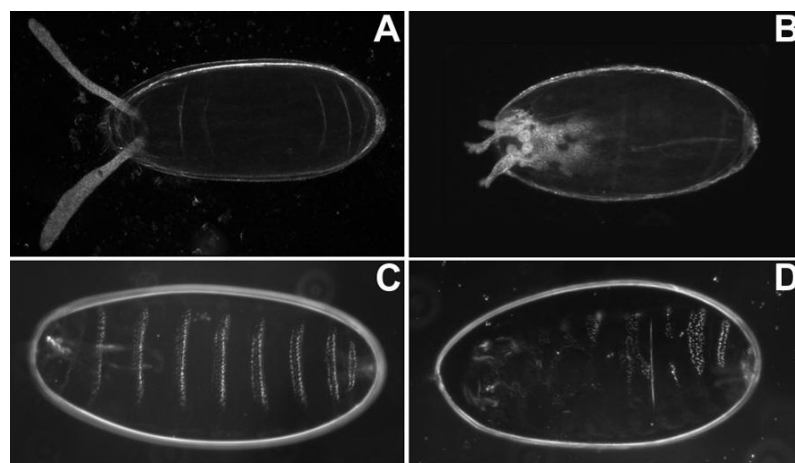
A transzheterozigóta nőtények fertilisek voltak, petéik morfológiája normális volt. Utódaik azonban, genotípustól függően különböző mértékben, ivarsejthiányos fenotípust mutattak. A *Dmoe^{G0415}*, *Dmoe^{G0404}*, *Dmoe^{G0067}* és az *Dmoe^{EP1652}* mutációk homozigóta formában életképesek voltak. A *Dmoe^{EP1652}* homozigóta nőtények fertilisek voltak, petéikben alacsony penetranciával ivarsejthiányos embriók fejlődtek (14. ábra).



14. ábra Vad típusú és *Dmoe^{G0415}/Dmoe^{EP1652}* mutáns nőstény által lerakott peték poszterior pólusa. **A**, A vad típusú pete poszterior pólusán lefűződő embrionális ivarsejteket nyílhegy mutatja. **B**, A mutáns embrió poszterior pólusán nincsenek embrionális ivarsejtek.

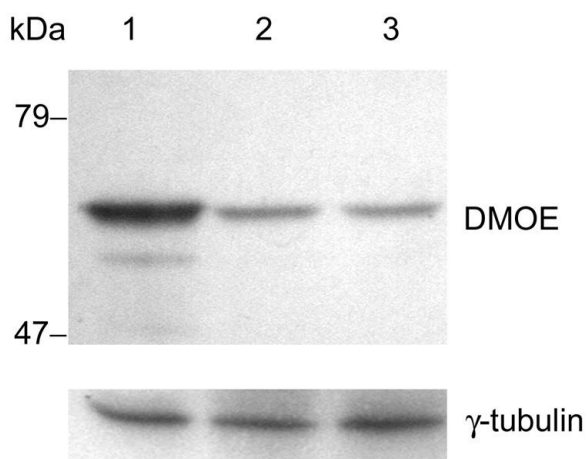
A *Dmoe^{G0415}*, *Dmoe^{G0404}*, *Dmoe^{G0067}* mutációk homozigóta formában, egymással illetve a *Dmoe^{G0323}* alléll transzheterozigóta kombinációban gyenge életképességű steril nőstényeket eredményeztek, melyek szárnya és szeme abnormalis volt. A szárnyakon számfeletti vénákat figyeltünk meg, súlyosabb esetben a szárny két lemeze között hólyagok jelentek meg. Szemeik rögzösek és csökevényesek voltak, kevés petét raktak, és az embriók soha nem jutottak el a kutikulaképzésig. A lerakott peték mérete kisebb volt a vad típusénál, ami a dajkasejtekből a petesejtbe tartó, gyors, aktinfüggő citoplazmaáramlás hibájára utal. A peték dorzális függelékei abnormalis morfológiájúak és méretűek voltak: megrövidültek és agancsszerűen elágaztak (15. ábra). A korion a pete dorzális részén megvastagodott: a dorzális függelék eredésétől kiindulva a korionon a dorzális függelékre jellemző anyag felhalmozódását tapasztaltuk (15. ábra). A *Dmoe^{EP1652}* allél a *Dmoe^{G0415}*, *Dmoe^{G0404}*, *Dmoe^{G0067}*, *Dmoe^{G0323}* allélekkel illetve a *Df(1)KA14* delécióval kombinálva életképes, szemisteril nőstényeket

eredményezett. A lerakott peték között találtunk abnormális méretűeket és abnormális dorzális függelékkel rendelkezőket. Az utód embriók ritkán kutikulát is képeztek, melyek mintázata változatos hibákat mutatott. A kutikula különböző részein lyukak jelentek meg, abnormális fejstruktúrák képződtek, illetve egyes szelvények egybeolvadtak vagy hiányoztak (15. ábra). A lerakott petékből rendkívül ritkán felnőtt utódok fejlődtek, melyek magas penetranciával (28%-61%) ivarsejthiányos fenotípust mutattak. A *Dmoe*^{G0323} homozigóta nőtények letálisak voltak. A szárny- és szemfenotípus expresszivitása, a steril és az ivarsejthiányos fenotípusok penetranciája és a homozigóta fenotípusok alapján a *Dmoe* allélokat allélerősség szerint a következő sorrendbe állítottuk: *GT193* < *EP1652* < *G0404* = *G0415* = *G0067* < *G0323* < *Df*. A *Dmoe* allélek komplementációs viselkedését a 4. táblázat mutatja. A további vizsgálatokat a jó életképességű, de magas penetranciájú ivarsejthiányos fenotípust mutató *Dmoe*^{EP1652}/*Dmoe*^{G0415} és a *Dmoe*^{EP1652}/*Df(1)KA14* hipomorf mutáns kombinációk felhasználásával végeztük.



15. ábra Korion és embrionális kutikula- preparátumok. A,B, Korionpreparátumok. Vad típusú (A) és *Dmoe*^{EP1652}/*Dmoe*^{G0415} (B) nőtények petéi. C,D, Embrionális kutikula-preparátumok. Vad típusú (C) és *Dmoe*^{EP1652}/*Dmoe*^{G0415} (D) nőtények utódainak embrionális kutikulája.

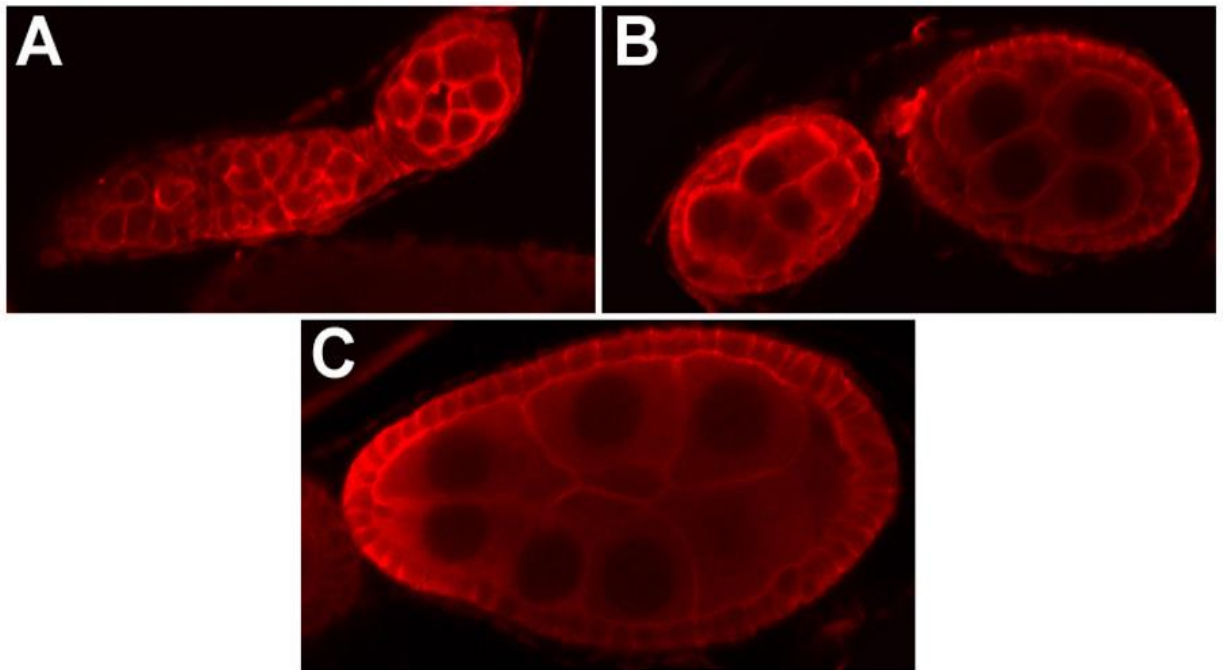
A *Dmoe*^{EP1652} és *Dmoe*^{G0415} P-elemek remobilizálásával bizonyítottuk, hogy a mutáns fenotípusért a *Dmoe* génbe beépült P-elemek a felelősek. A P-elem kiugrását a *miniwhite* markergén elvesztésével követtük. Mindkét allél esetén a P-elemek kiugrása visszaállította a vad fenotípust. Western analízissel megvizsgáltuk, hogy a *Dmoe* mutáns petefészkek DMOE fehérje-tartalmát. A Western analízis számítógépes denzitometriai vizsgálata megmutatta, hogy a *Dmoe*^{EP1652}/*Dmoe*^{G0415} és a *Dmoe*^{EP1652}/*Df(1)KA14* mutánsban a DMOE fehérje mennyisége felére, a *Dmoe*^{G0067}/*Dmoe*^{G0415} mutánsban pedig negyedére csökkent (16. ábra, nincs bemutatva). A genetikai adatok és Western analízis egyértelműen mutatják, hogy ezek az allélkombinációk hipomorf *Dmoe* mutáns fenotípust eredményeznek.



16. ábra A *Dmoe* mutáns petekamrák Western-analízise. A vad típusú ováriumkivonatban az anti-DMOE ellenanyag egy fehérjét ismer fel a *Dmoe* aminosavszekvenciája alapján számított 67 kDa-nál (1.oszlop). A *Dmoe*^{EP1652}/*Dmoe*^{G0415} (2.oszlop) és a *Dmoe*^{EP1652}/*Df(1)KA14* (3.oszlop) mutánsokban a felismert fehérje mennyisége lecsökkent. A felviteli kontrol γ -Tubulin volt.

A DMOE kifejeződési mintázata

Immunolokalizációs kísérlettel megvizsgáltuk a DMOE fehérje eloszlását a petekamrában. A DMOE fehérje a peteérés kezdetétől folyamatosan, a peteérés végéig minden fejlődési szakaszban megtalálható a petekamrában (MCCARTNEY és FEHON 1996). Erős festődést találtunk a follikuláris sejtekben, mely a sejtek apikális és bazolaterális részén a volt a legkifejezettebb. Az ivarsejtekben gyenge festődést mutattunk ki minden fejlődési stádiumban, főként a peteérés korai, a másodiktól az ötödik stádiumig terjedő szakaszaiban, illetve a tizedik stádiumban (17. ábra). A DMOE fehérje a follikuláris sejtekben és az ivarsejtekben egyaránt szorosan a sejtmembrán alatt helyezkedett el. Nem találtunk DMOE fehérjét sem a gyűrűcsatornák aktinjához, sem a tizedik stádiumban a dajkasejtekben megjelenő citoplazmatikus aktinhoz kapcsolódva. DMOE ellenanyagossal immunfestéssel a *Dmoe* mutáns petekamrákban nem tudtunk kimutatni különbséget a vad típustól: a *Dmoe^{EP1652}/Dmoe^{G0415}* és a *Dmoe^{EP1652}/Df(1)KA14* mutáns petekamrákban immunfestéssel nem mutatható ki a DMOE fehérje mennyiségének csökkenése. Az immunfestéssel kapott eredmény látszólag ellentmond a Western analízisnek, de ez az ellentmondás felolgható azzal, hogy a szöveti immunfestés nem elég érzékeny módszer egy fehérje mennyiségének kvantitatív kimutatására. DMOE ellenanyagossal immunfestéssel a *Dmoe^{EP1652}/Dmoe^{G0415}* és a *Dmoe^{EP1652}/Df(1)KA14* mutáns petekamrákban nem találtunk ektopikus DMOE fehérje kifejeződést: a DMOE minden esetben a sejtekben szorosan a sejthártya alatt helyezkedett el.



17. ábra A DMOE fehérje immunfestése. **A,** A DMOE fehérje eloszlása vad típusú germáriumban és egy ötödik stádiumos petekamrában. **B,** A DMOE fehérje eloszlása hatodik és hetedik stádiumú petekamrában. **C,** A DMOE fehérje eloszlása egy nyolcadik stádiumú petekamrában.

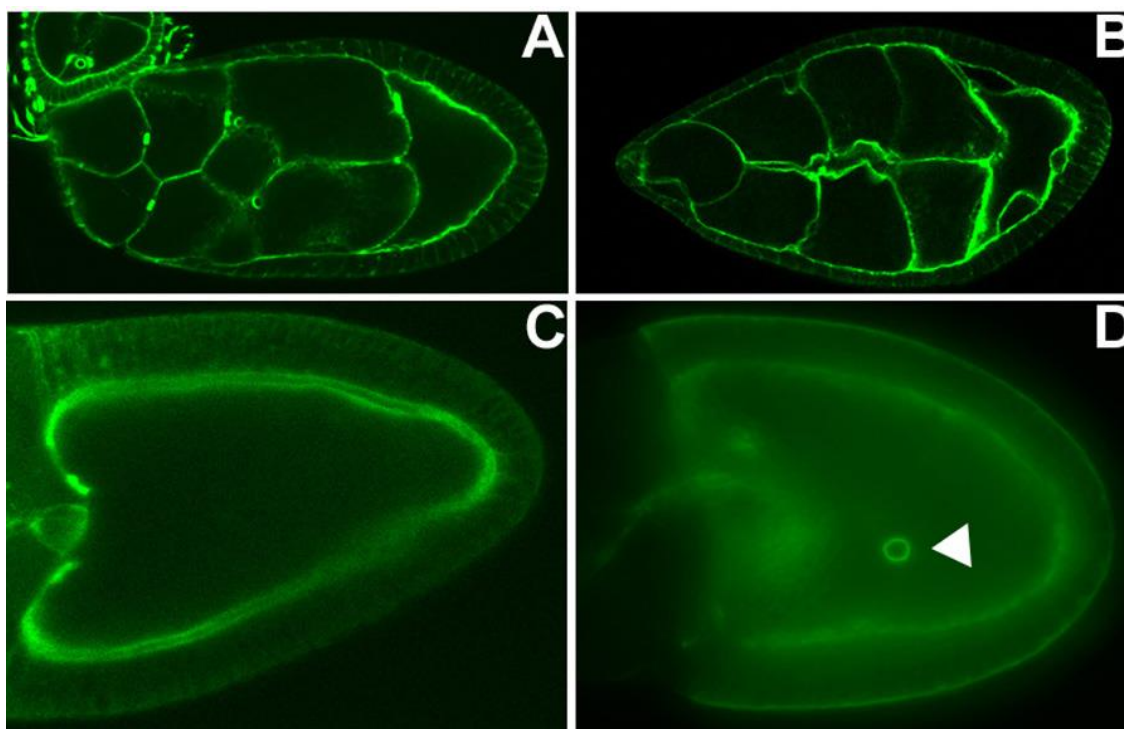
A *Dmoe* mutációja az ivarsejtekben aktinhibákat okoz

Mivel a DMOE emlős homológjai aktinkötő fehérjék, és a DMOE is rendelkezik aktinkötő doménnel, megvizsgáltuk az aktin eloszlását a *Dmoe* mutáns petekamrákban. A petérés nyolcadik stádiumáig a mutáns petekamrák aktinváza nem tért el a vad típusától. A peteérés kilencedik és tizedik stádiumában lévő *Dmoe*^{EP1652}/*Dmoe*^{G0415} és a *Dmoe*^{EP1652}/*Df(1)KA14* mutáns petekamrákban azonban abnormalis aktinvázat találtunk (18. ábra, 5. táblázat). A vad típusra jellemző szoros szubkortikális eloszlás helyett a mutáns petekamrákban a petesejt aktinváza elvált a kéregtől, és benyomult a petesejt belsejébe (18. ábra). Az aktinváz leválásának helye petesejtenként változott, előfordult a petesejt laterális részén és a poszterior póluson is. A szomszédos dajkasejtek vad típusú, párhuzamos lefutású szubkortikális aktinváza helyett a *Dmoe*^{EP1652}/*Dmoe*^{G0415} és a *Dmoe*^{EP1652}/*Df(1)KA14* mutáns petekamrákban a szomszédos dajkasejtek aktinvázai is

elváltak egymástól (18. ábra). A mutáns petesejtek citoplazmájának belsejében gyakran találtunk a sejthártyáról leszakadt gyűrűcsatornákat (18. ábra). A mutáns petekamrákban a follikuláris sejtek aktinvázán nem találtunk eltérést a vad típushoz képest.

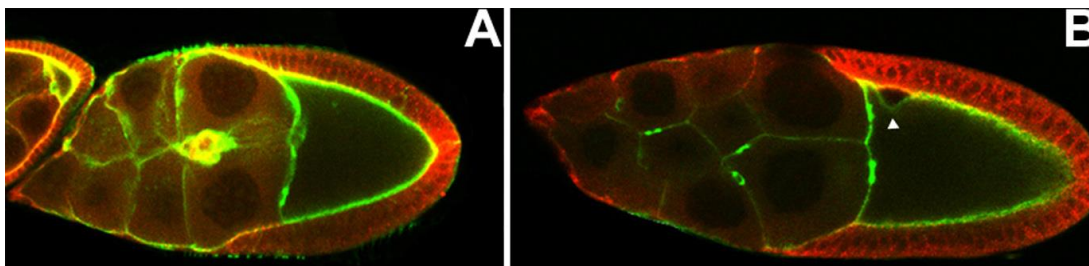
5. táblázat. Az aktinváz eloszlása a *Dmoe* mutáns petekamrákban (%)

genotípus	szubkortikális	betüremkedések
<i>Oregon R</i> (n=144)	100	0
<i>Dmoe^{EP1652}/Dmoe^{G0415}</i> (n=101)	73,3	26,7
<i>Dmoe^{EP1652}/Df(1)Ka14</i> (n=23)	87,0	13,0



18. ábra Az aktin eloszlása a *Dmoe* mutáns petekamrákban. **A**, Normális aktineloszlás egy 9. Stádiumú, vad típusú petekamrában. **B**, A 9. Stádiumú *Dmoe*^{EP1652}/*Dmoe*^{G0415} mutáns petekamrában a petesejt szubkortikális aktinváza számos helyen elválk a kéregtől. **C**, Vad típusú 10. stádiumú petesejt aktinváza. **D**, *Dmoe*^{EP1652}/*Dmoe*^{G0415} mutáns 10. stádiumú petesejt aktinváza. A nyílhegy a sejthártyáról leszakadt gyűrűcsatornát jelzi.

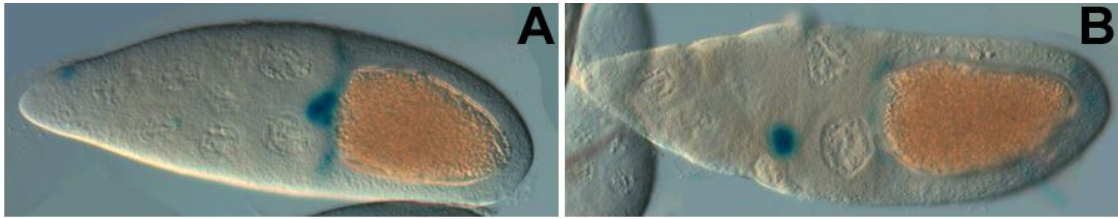
A *Drosophila* E-cadherin (*DE-cadherin*) fehérjéjének immunfestésével megvizsgáltuk az ivarsejtek közötti sejtadhéziót a *Dmoe* mutáns petekamrákban. A DE-cadherin egy transzmembrán fehérje, és a petekamrában az ivarsejtek és a follikuláris sejtek membránján is megtalálható (ODA és mtsai. 1997). A mutáns petekamrákban nem tudtunk abnormalis DE-cadherin eloszlást kimutatni (19. ábra). Az aktin és a DE-cadherin egyidejű festése azt mutatta, hogy a DE-cadherin nem kolokalizálódott a petesejtbe betüremkedő szubkortikális aktinvázzal (19. ábra). Ez azt bizonyítja, hogy a *Dmoe* mutáns petekamrákban a sejtadhézió normális, és nem a szomszédos sejtek szakadnak el egymástól, hanem a szubkortikális aktinváz válik el a sejthártyától.



19. ábra Aktin és DE-cadherin együttes festése. **A,** A vad típusú petesejtben az aktin (zöld) és a DE-cadherin (piros) kolokalizálódik. **B,** A *Dmoe^{EP1652}/Dmoe^{G0415}* mutáns petesejtben az aktinváz betüremkedésének a helyén (nyíl) a DE-cadherin lokalizációja normális.

A *Dmoe* mutációja a bordersejtek vándorlásának késését okozza

Mivel az aktinváz szükséges a morfogenetikai sejtmozgásokhoz, az anterior poláris follikuláris sejtekre (bordersejtek) specifikus *slbo*^l enhanszercsapda marker segítségével, megvizsgáltuk a bordersejtek mozgását a *Dmoe* mutáns petekamrákban. A vad típusú petekamrákban a bordersejtek a peteérés kilencedik stádiumának elején kezdenek el vándorolni a petekamra anterior csúcsától és behatolnak a dajkasejtek közé, és a tizedik stádiumban elérik a petesejt anterior részét. A *Dmoe^{EP1652}/Dmoe^{G0415}* mutáns petekamrákban azonban a petekamrák egy részében (44-ből 9 esetben) a bordersejtek a tizedik stádium végén sem érték el a petesejtet, hanem a dajkasejtek között helyezkedtek el (20. ábra). Szélsőséges esetben a bordersejtek be sem hatoltak a dajkasejtek közé és a tizedik stádiumban is a petekamra anterior csúcsán helyezkedtek el (nincs bemutatva).



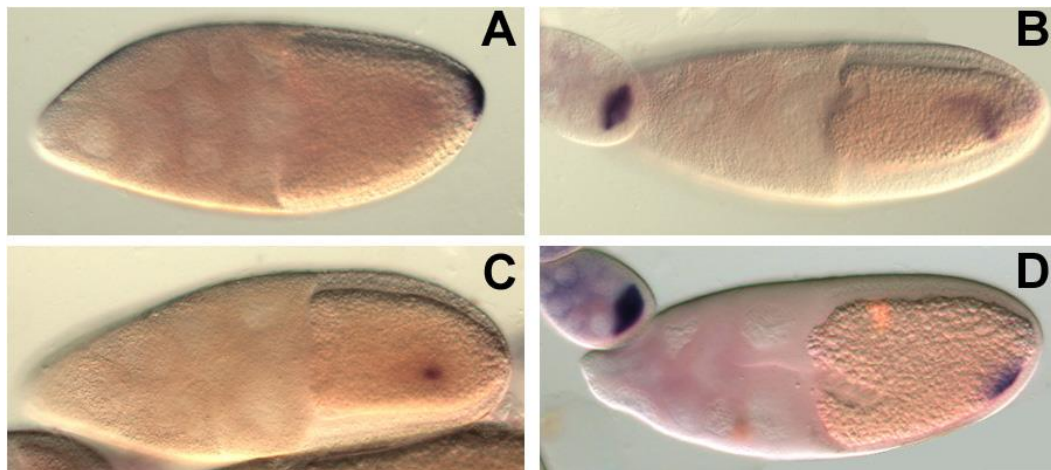
20. ábra A bordersejtek megjelenítése *slbo*¹ enhanszercsapda marker β -Gal -festésével. A, Vad típusú, 10.stádiumú petekamrában a bordersejtek elérik a petesejt anterior peremét. B, A 10. stádiumú, *Dmoe*^{EP1652}/*Df(1)KA14* mutáns petekamrában a bordersejtek nem jutnak el a petesejtig.

A *Dmoe* mutációja hibás *osk* mRNS és fehérje lokalizációt okoz

Mivel a *Dmoe* mutáns nőtények ivarsejthiányos petéket raktak, megvizsgáltuk az *osk* mRNS mennyiségét és eloszlását a hipomorf *Dmoe* mutáns petekamrákban. A mutáns petekamrákban az *osk* mRNS jól lokalizálódott a peteérés nyolcadik stádiumáig. A peteérés további stádiumaiban *in situ* hibridizációval a *Dmoe* mutáns és a vad petesejtek azonos hányadában tudtunk *osk* mRNS-t kimutatni (6. táblázat). A mutáns petekamrákban azonban a a vad típusra jellemző szoros poszterior lokalizáció helyett számos, különböző típusú abnormális *osk* mRNS lokalizációt találtunk kilencedik stádiumtól kezdődően. A leggyakrabban előforduló lokalizációs hiba az *osk* mRNS szétszórt, többnyire a poszterior pólus közelében történő lokalizációja volt (21. ábra). A mutáns petesejtek egy részében az *osk* mRNS részlegesen vagy teljesen a petesejt közepén lokalizálódott. A tizedik stádiumú mutáns petekamrákban találtunk a petesejt laterális részén, szorosan a kéreg alatt lokalizált *osk* mRNS-t is (21. ábra).

6. táblázat. Az *osk* mRNS hibás lokalizációja a *Dmoe* mutáns petekamrákban (%)

genotípus	poszterior lokalizáció	hibás lokalizáció			
		nincs festődés	poszterior mintázatos	laterális	közép
<i>Oregon R</i> (n=137)	71,5	28,5	0	0	0
<i>Dmoe^{EP1652}/Dmoe^{G0415}</i> (n=204)	33,8	33,3	24,5	2,5	5,4
<i>Dmoe^{EP1652}/Df(1)KA14</i> (n=143)	30,0	34,3	32,2	1,3	2,0



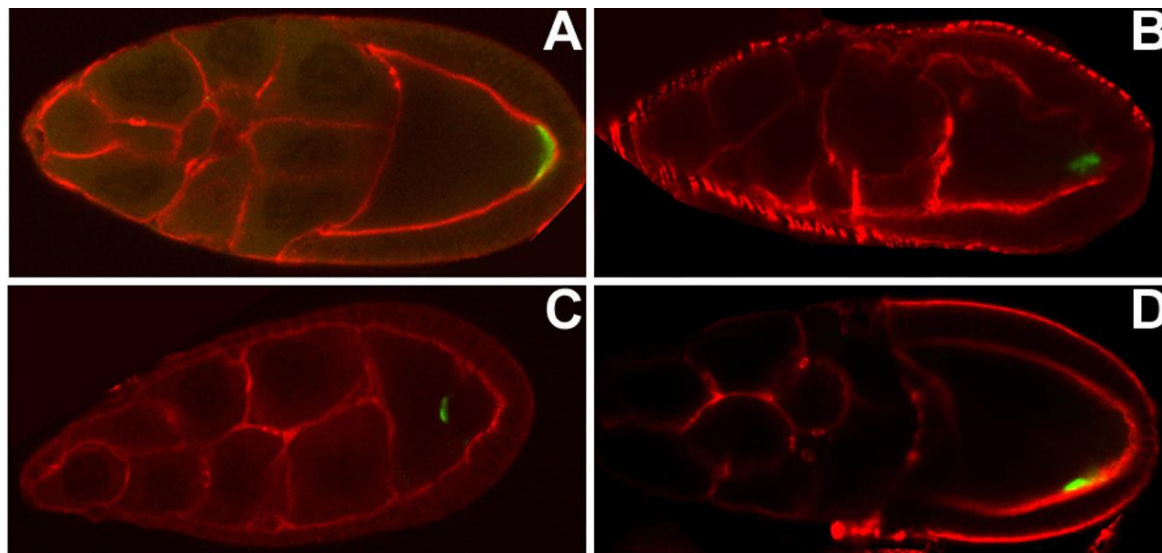
21. ábra *In situ* *osk* mRNS hibridizáció. A, Vad típusú *osk* mRNS lokalizáció a petesejt poszterior pólusán. B-D, Az *osk* mRNS eloszlása a *Dmoe^{EP1652}/Dmoe^{G0415}* mutáns petesejtekben. Az *osk* mRNS a poszterior pólus környékén szétszórt mintázatban (B), vagy a petesejt közepén (C), vagy a petesejt laterális részén, szorosan a kéreg alatt lokalizálódott (D). A *Dmoe^{EP1652}/Df(1)KA14* mutánsok hasonló fenotípust mutattak.

A *Dmoe* mutánsokban az *osk* mRNS-sel kolokalizálódó STAU fehérje mennyisége és eloszlása szintén abnormális volt. Az *osk* mRNS-hez hasonlóan a mutáns petesejtekben nem találtunk, illetve csökkent mennyiségben találtunk STAU fehérjét (7. táblázat). A *Dmoe^{EP1652}/Dmoe^{G0415}* mutáns petesejtekben a peteérés nyolcadik stádiumáig a STAU fehérje elhelyezkedése nem tért el a vad típusától. A kilencedik stádiumtól azonban a

STAU fehérje az *osk* mRNS-sel azonos lokalizációs abnormalitásokat mutatott. A mutáns petesejtekben a STAU fehérje a poszterior pólus közelében szétszórt mintázatot alkotva, a petesejt közepén, illetve a tizedik stádiumú petesejt laterális részén, szorosan a kéreg alatt lokalizálódott (22. ábra).

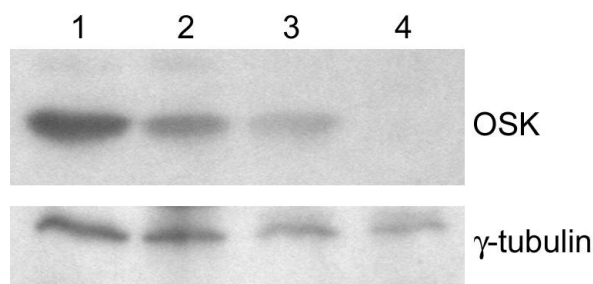
7. táblázat. A STAU fehérje lokalizációja a *Dmoe* mutáns petekamrákban (%)

genotípus	poszterior lokalizáció	hibás lokalizáció			
		nincs festődés	poszterior mintázatos	laterális	közép
<i>Oregon R</i> (n=198)	68,7	31,3	0	0	0
<i>Dmoe</i> ^{EP1652} / <i>Dmoe</i> ^{G0415} (n=158)	29,1	48,1	17,7	3,2	1,9



22. ábra Az aktin és a STAU fehérje együttes festése. (aktin piros, STAU zöld) **A**, A STAU fehérje a vad típusú petesejt poszterior pólusán lokalizálódik. **B-D**, A STAU fehérje eloszlása a *Dmoe*^{EP1652}/*Dmoe*^{G0415} mutáns petesejtekben. A STAU fehérje a poszterior pólus környékén szétszórt mintázatban (B), vagy a petesejt közepén (C), vagy a petesejt laterális részén, szorosan a kéreg alatt lokalizálódott (D). A *Dmoe*^{EP1652}/*Df(1)KA14* mutánsok hasonló fenotípust mutattak.

Mivel számos mutánsban (*Notch*, *lamininA*, *PKA*, *par1*) az ektopikusan lokalizált *osk* mRNS az OSK fehérje hibás lokalizációját eredményezi, megvizsgáltuk a *Dmoe* mutációinak hatását az OSK fehérje mennyiségére és lokalizációjára is. Az OSK fehérje mennyiségét a *Dmoe* mutáns petekamrákban Western analízissel vizsgáltuk meg. A Western analízis számítógépes denzitometriai vizsgálata megmutatta, hogy a *Dmoe*^{EP1652}/*Dmoe*^{G0415} mutáns petefészkekben az OSK fehérje mennyisége a vad típuséhoz képest a felére, a *Dmoe*^{EP1652}/*Df(1)KA14* mutáns petefészkekben az ötödére csökkent (23. ábra).



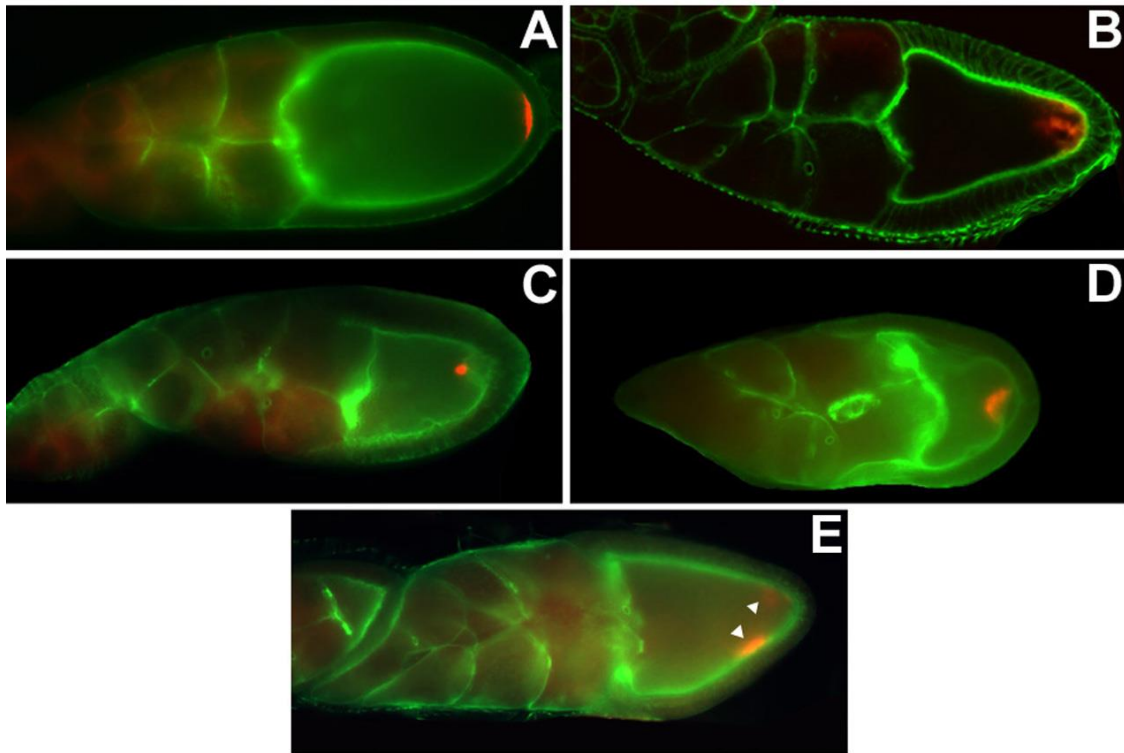
23. ábra Az OSK fehérje mennyiségének vizsgálata a *Dmoe* mutáns petekamrákban. A vad típusú ováriumkivonat western- analízise anti-OSK ellenanyaggal (1.oszlop). A *Dmoe*^{EP1652}/*Dmoe*^{G0415} (2.oszlop) és a *Dmoe*^{EP1652}/*Df(1)KA14* (3.oszlop) mutánsokban az OSK fehérje mennyisége lecsökkent. A negatív kontrol *osk*⁸⁴/*Df(3)PXT103* volt (4.oszlop). A felviteli kontrol γ -Tubulin volt.

Ezzel összhangban, immunfestéssel a *Dmoe*^{EP1652}/*Dmoe*^{G0415} és a *Dmoe*^{EP1652}/*Df(1)KA14* mutáns petekamrák nagy részében egyáltalán nem tudtunk OSK fehérjét kimutatni, a többi mutáns petekamrában pedig csökkent mennyiségű OSK fehérjét találtunk a poszterior póluson (8. táblázat). A peteérés kilencedik stádiumától a *Dmoe*^{EP1652}/*Dmoe*^{G0415} és a *Dmoe*^{EP1652}/*Df(1)KA14* mutáns petekamrákban a vad típusra jellemző szoros, félholdszerű poszterior lokalizáció helyett abnormális OSK lokalizációt tapasztaltunk. A mutáns petesejtekben az OSK fehérje a poszterior pólus közelében szétszórt mintázatot alkotva lokalizálódott. A mutáns petesejtekben

kimutattunk a petesejt közepén, illetve a tizedik stádiumú petesejtek laterális részén, szorosan a kéreg alatt elhelyezkedő OSK fehérjét is (24. ábra). Az aktinváz és az OSK fehérje egyidejű festésével az aktin és az OSK fehérje lokalizációja között szoros összefüggést mutattunk ki. Azokban a mutáns petesejtekben, melyekben az aktinváz a poszterior póluson vált el a kéregtől a hibásan lokalizált OSK fehérje gyakran kolokalizálódott az abnormális aktinvázzal. Ez arra utal, hogy az OSK fehérje az aktinvázhoz kötődik.

8. táblázat. Az OSK fehérje lokalizációja a *Dmoe* mutáns petekamrákban (%)

genotípus	poszterior lokalizáció	hibás lokalizáció			
		nincs festődés	poszterior mintázatos	laterális	közép
<i>Oregon R</i> (n=124)	92,7	7,3	0	0	0
<i>Dmoe</i> ^{EP1652} / <i>Dmoe</i> ^{G0415} (n=201)	29,4	33,3	25,9	8,0	3,5
<i>Dmoe</i> ^{EP1652} / <i>Df(1)KA14</i> (n=165)	10,9	64,8	21,2	1,8	1,2



24. ábra Az aktin és az OSK fehérje együttes festése. (aktin zöld, OSK piros) **A**, A vad típusú petesejtben az OSK fehérje a poszterior póluson lokalizálódik. **B-D**, A *Dmoe^{EPI652}/Dmoe^{G0415}* mutáns festése. A mutáns petesejtben az OSK fehérje a poszterior pólus környékén szétszórt mintázatban lokalizálódik (B). A mutánsban a szubkortikális aktin elválik a poszterior kéregtől és kolokalizálódik az ektopikus OSK fehérjével (C,D.). A mutáns petesejtben az OSK fehérje a laterális aktinvázhoz kapcsolódik (E). A nyílhegyek a laterális OSK fehérje elhelyezkedését mutatják. A *Dmoe^{EPI652}/Df(1)KA14* mutánsok hasonló fenotípust mutattak.

A *Dmoe* hatása a petekamrában ivarsejtvonal-függő

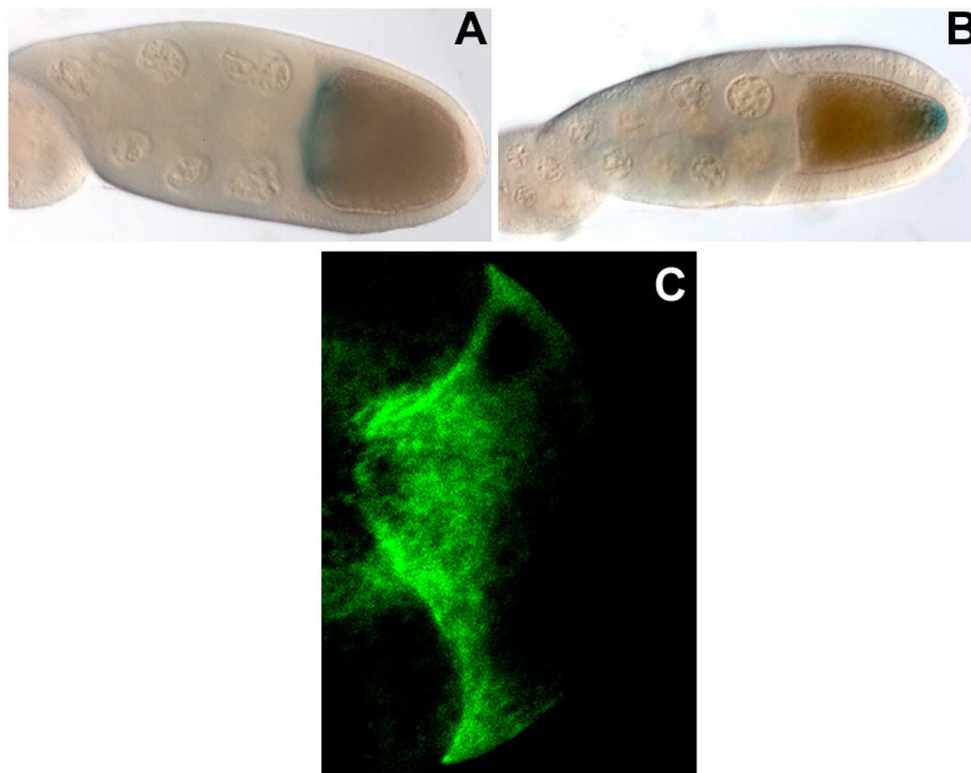
Mivel az *osk* mRNS és az OSK fehérje helyes lokalizációjához a petesejt és a poszterior follikuláris sejtek normális működése egyaránt szükséges, megvizsgáltuk, hogy a *Dmoe* mutációk fenotípusa ivarvonalfüggő-e. A *Dmoe* homozigóta ivarsejtvonal-klónokat az ovoD-FRT módszerrel indukáltuk (CHOU és PERRIMON 1996) és megvizsgáltuk bennük az *osk* mRNS és az OSK fehérje lokalizációját, illetve a mutáns ivarsejtklónok aktinvázát. A *Dmoe^{G0415}*, *Dmoe^{G0404}*, *Dmoe^{G0067}*, *Dmoe^{G0323}* allélekre homozigóta ivarsejtklónokban a *Dmoe* transzheterozigótakéval teljesen megegyező nősténysteril fenotípust találtunk. A homozigóta ivarsejtklónokat hordozó nőstények lerakott petéi

nem keltek ki, bennük az embrió a kutikulaképzés előtt elpusztult. A lerakott peték között találtunk kis méretű és abnormális dorzális függelékkel rendelkezőket. Az *ovoD*-mentes petesejtekben ugyanazokat az *osk* mRNS és OSK fehérje lokalizációs hibákat tudtuk kimutatni, amit a *Dmoe* transzheterozigótákban. A homozigóta ivarsejtklónokban az *osk* mRNS és az OSK fehérje a poszterior pólus közelében szétszórt mintázatot alkotva vagy a petesejt közepén, illetve a petesejt laterális részén, szorosan a kéreg alatt lokalizálódott. A homozigóta ivarsejtklónokban a *Dmoe* transzheterozigótákra jellemző aktinhibákat találtunk: a petesejt aktinváza elvált a kéregtől, és benyomult a petesejt belsejébe. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy a pete normális fejlődéséhez a *Dmoe* működésére az ivarsejtekben van szükség.

A *Dmoe* a mikrotubulusoktól függetlenül hat az *osk* lokalizációra

Idő előtti ooplazmatikus áramlás indukálásával számos aktinkötő fehérje (*cappuchino*, *spire*, *chikadee*) mutációja eredményezi az *osk* mRNS és az OSK fehérje hibás lokalizációját a petesejt közepén (MANSEAU és mtsai. 1996; THEURKAUF 1994). Ezekben a mutánsokban a nyolcadik stádiumú vad petesejtre jellemző anteriortól poszterior irányba csökkenő mikrotubulus-grádiens helyett, a mikrotubulusok a petesejt kérge mentén rendeződnek el. Mivel az ooplazmaáramlás mikrotubulusfüggő, és a mikrotubulusváz jellegzetes változásával jár együtt, immunfestéssel, Tau:GFP és Tubulin:GFP fúziós fehérjék segítségével megvizsgáltuk a mikrotubulusok eloszlását a *Dmoe* mutáns petesejtekben. A *Dmoe*^{EP1652}/*Dmoe*^{G0415} és a *Dmoe*^{EP1652}/*Df(1)KA14* mutáns petesejtekben a mikrotubulusok vad típusú eloszlást mutattak. A mutáns petesejtekben a peteérés nyolcadik stádiumában is a vad típusra jellemző anterior-poszterior mikrotubulus- grádiens figyelhető meg (25. ábra), bizonyítva, hogy a *Dmoe*

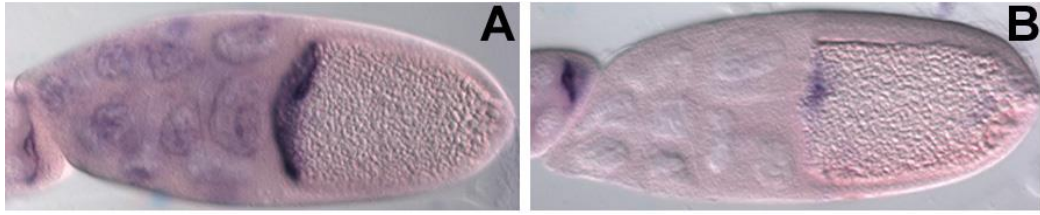
mutációi nem az idő előtti ooplazmaáramlás indukálásával okoznak hibás *osk* mRNS és fehérje lokalizációt.



25. ábra A mikrotubulusváz megjelenítése *Dmoe^{EP1652}/Dmoe^{G0415}* mutáns petesejtekben. A,B, β-Gal -festés. A mutáns petesejtben a Nod:β-Gal fúziós fehérje az anterior póluson lokalizálódik (A), a Kin:β-Gal fúziós fehérje a poszterior póluson található (B). C, Mikrotubulusok megjelenítése Tubulin:GFP-vel. A fluoreszcencia anterior- poszterior irányú csökkenő grádiense a petesejtben normális mikrotubulus-polaritást jelez.

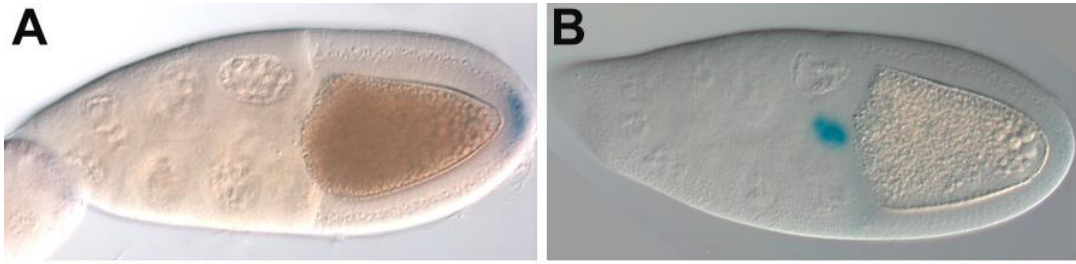
A petesejt sejtvezének átalakulásához szükséges petesejt- follikuláris sejt kommunikációra ható gének (*Notch*, *Delta*, *lamininA*, *Merlin*, *grk*, *cornichon*) mutánsaiban is megfigyelték az *osk* mRNS és az OSK fehérje hibás lokalizációját a petesejt közepére (DENG és RUOHOLA-BAKER 2000; GONZALEZ-REYES és mtsai. 1995; LANE és KALDERON 1994; MACDOUGALL és mtsai. 2001; ROTH és mtsai. 1995; RUOHOLA és mtsai. 1991; XU és mtsai. 1992). Ezekben a mutánsokban hibás, szimmetrikus mikrotubulus- váz található, ami az *osk* mRNS-t a petesejt

közepére, a *bcd* mRNS-t pedig egyidejűleg az anterior és a poszterior pólusra is irányítja. A mikrotubulusváz pozitív végét megjelölő Kin:β-Gal fúziós fehérje ezekben a mutánsokban a petesejt közepén, a mikrotubulusok negatív végét jelölő Nod:β-Galaktozidáz fúziós fehérje pedig a petesejt anterior és poszterior pólusán lokalizálódik. Ilyen szimmetrikus mikrotubulus-vázzal rendelkező petesejtben a sejtmag gyakran nem jut el az anterodorzális sarokba, hanem a poszterior póluson marad (GONZALEZ-REYES és mtsai. 1995; ROTH és mtsai. 1995). A *Dmoe* mutációi azonban nem hatnak a petesejt és a follikuláris sejtek kommunikációjára. Immunfestéssel és a mikrotubulusok közvetlen megjelenítésével megmutattuk, hogy a *Dmoe* mutációk, a *Notch*, *lamininA*, *Merlin*, *grk*, *cornichon* mutációktól eltérően, soha nem eredményeznek szimmetrikus mikrotubulus vázat. A *Dmoe*^{EP1652}/*Dmoe*^{G0415} és a *Dmoe*^{EP1652}/*Df(1)KA14* mutánsban nem találtunk mikrotubulus-felhalmozódást a nyolcadik és kilencedik stádiumú petesejtek poszterior pólusán, bizonyítva, hogy a poszterior póluson lévő MTOC a vad típushoz hasonlóan lebomlott (25. ábra). Ezzel összhangban a Kin:β-Gal és a Nod:β-galaktozidáz fúziós fehérjék vad típusú eloszlást mutattak a *Dmoe*^{EP1652}/*Dmoe*^{G0415} és a *Dmoe*^{EP1652}/*Df(1)KA14* mutánsban, azaz a mutáns petesejtekben a Kin:β-Gal a petesejt poszterior pólusán a Nod:β-Gal a petesejt anterior pólusán lokalizálódott (25. ábra). A mutánsban nem tudtunk kimutatni ektopikus *bcd* mRNS-t a poszterior póluson, és a *grk* mRNS, illetve a petesejt magja is helyesen lokalizálódott a petesejt anterodorzális sarkában, bizonyítva, hogy a *Dmoe* nincs hatással a follikuláris sejtekből a petesejthez tartó kommunikációra (26. ábra).



26. ábra *In situ* *grk* és *bcd* mRNS hibridizáció. **A**, A *Dmoe*^{EP1652}/*Dmoe*^{G0415} mutáns petesejtben a *bcd* mRNS az anterior póluson lokalizálódik. **B**, A *Dmoe*^{EP1652}/*Dmoe*^{G0415} mutánsban a *grk* mRNS az anterodorzális sarokban lokalizálódik. A *Dmoe*^{EP1652}/*Df*(1)*KA14* mutánsok hasonló fenotípust mutattak.

A *Dmoe* mutánsokban a petesejtből a follikuláris sejtekhez tartó kommunikáció is jól működik. Az ezirányú kommunikációhoz szükséges *grk* és *chornichon* gének mutánsaiban a poszterior follikuláris sejtek nem differenciálódnak, és a petekamra poszterior végén anterior follikuláris sejtekké fejlődnek (ROTH és mtsai. 1995). Ezek a sejtek nem a poszterior follikuláris sejtekre jellemző 998/12, hanem az anterior follikuláris sejtekre jellemző *slbo*¹ enhanszer- csapda markert fejezik ki. A *Dmoe*^{EP1652}/*Dmoe*^{G0415} és a *Dmoe*^{EP1652}/*Df*(1)*KA14* mutáns petekamrákban azonban a vad típusra jellemző enhanszer-csapda kifejeződést találtunk (27. ábra). Ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy a *Dmoe* nem szükséges a petesejt-follikuláris sejt kommunikáció egyik lépéséhez sem.

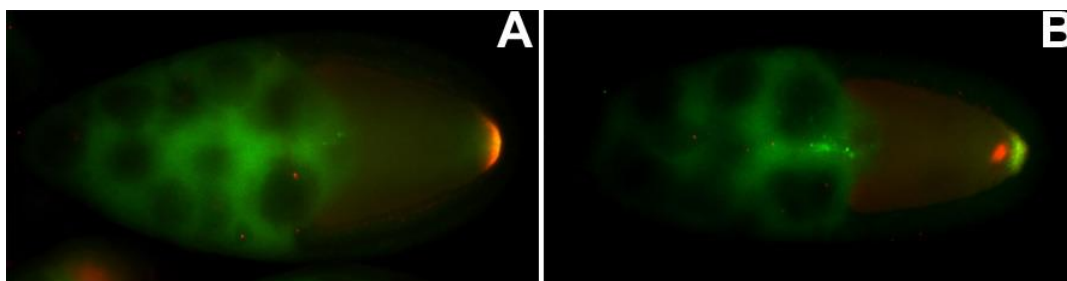


27. ábra Follikuláris sejtcsoportok β -Gal festése. **A,** A *Dmoe^{EP1652}/Dmoe^{G0415}* mutáns petekamrában a poszterior follikuláris sejtek kifejezik a poszterior poláris follikuláris sejtekre jellemző (998/12) specifikus enhanszercsapda markert. **B,** A *Dmoe^{EP1652}/Dmoe^{G0415}* mutánsban az anterior poláris follikuláris sejtekre specifikus *slbo¹* enhanszercsapda marker nem fejeződik ki a poszterior poláris follikuláris sejtekben.

A *par1* és a *Rab11* gének mutációi a *Dmoe*-hez hasonló hibás *osk* mRNS és OSK fehérje lokalizációt okoznak, a petesejt és a follikuláris sejtek közötti kommunikáció befolyásolása nélkül (DOLLAR és mtsai. 2002; JANKOVICS és mtsai. 2001; SHULMAN és mtsai. 2000; TOMANCAK és mtsai. 2000). A *par1* mutánsokban a *Dmoe*-hez hasonlóan, nem sikerült szimmetrikus mikrotubulusvázat kimutatni. Ezekben a mutánsokban azonban, a *Dmoe*-től eltérően, a Kin: β -Gal a petesejt közepén lokalizálódott. A hibás Kin: β -Gal lokalizáció a *par1* mutánsokban abnormális mikrotubulus-eloszlás eredménye volt: a vad típusú anterior-poszterior mikrotubulus-grádiens helyett a mutáns petesejtekben kortikális mikrotubulus keletkezett. A *Dmoe* mutáns petekamrákban azonban sem abnormális Kinesin: β -Galaktozidáz lokalizációt, sem abnormális mikrotubulusvázat nem mutattunk ki (25. ábra).

A STAU és a Kin: β -Gal fehérjék egyidejű immunfestésével kapott eredmények is azt támasztják alá, hogy a *Dmoe* a mikrotubulusoktól függetlenül hat az *osk* mRNS és az OSK fehérje lokalizációjára. Bár a *Dmoe* mutáns petekamrákban a Kin: β -Gal a vad típushoz hasonlóan jól lokalizálódott a poszterior póluson, ugyanabban a petesejtben abnormális STAU lokalizációt találtunk (28. ábra). Ez azt jelzi, hogy annak ellenére,

hogy a mikrotubulusok plusz végei a poszterior pólusra mutatnak, a STAU fehérje nem lokalizálódik a poszterior póluson. A Kin:β-Gal és az *osk* mRNS-sel kolokalizálódó STAU fehérje együttes megjelenítésével bebizonyítottuk, hogy a *Dmoe* mutánsokban az *osk* mRNS és az OSK fehérje hibás lokalizációjának az oka nem a mikrotubulusváz hibája. A *Dmoe* mutáns petesejtben a STAU fehérje és az *osk* mRNS eljut a poszterior pólusra, de ott nem rögzül. Kísérleteink bizonyítják, hogy a *Dmoe* nem az *osk* mRNS szállítására, hanem az *osk* géntermékek poszterior póluson történő rögzítésére hat.



28. ábra STAU és KIN:β-Gal fehérjék együttes immunfestése. (STAU piros, Kin:β-Gal zöld) **A**, A vad típusú petekamrában a STAU és Kin:β-Gal fehérjék a petesejt poszterior pólusán lokalizálódnak. **B**, A *Dmoe*^{EP1652}/*Dmoe*^{G0415} mutáns petesejtben a Kin:β-Gal helyesen lokalizálódik, míg a STAU fehérje ectopikusan helyezkedik el.

AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

A potroh és az ivarsejtek kialakulását befolyásoló gének azonosítása céljából, kidolgoztunk és végrehajtottunk egy domináns genetikai interakción alapuló mutánsizolálási kísérletet. *TmII* és *osk* allélek felhasználásával érzékenyített genetikai hátteret hoztunk létre, melyet sikeresen alkalmaztunk a petesejtek és a potroh kialakulását befolyásoló gének azonosítására. Az új mutánsokat térképeztük és komplementációs vizsgálatnak vetettük alá őket. Elvégeztük az egyik, genetikai interakció alapján azonosított gén, a *Rab11*, részletes komplementációs és fenotípusos analízisét. Bemutattuk, hogy a *Rab11* mutáns petesejtekben az *osk* mRNS hibásan lokalizálódik, míg más morfogén molekulák lokalizációja illetve a petesejt és a follikuláris sejtek közötti kommunikáció ép marad. Kimutattuk, hogy a *Rab11* szükséges az *osk* mRNS-t szállító polarizált mikrotubulusváz helyes működéséhez.

Egy másik mutagenézis során géncsapda elven működő P-elemmel ivarsejthiányos fenotípusa alapján izoláltuk a *Dmoe* gén egy allélját. Komplementációs analízissel további *Dmoe* alléleket azonosítottunk. A különböző erősségű alléleket felhasználva leírtuk a *Dmoe* mutáns fenotípust, részletesen feltártuk a *Dmoe* petefejlődésben játszott szerepét. *In situ* hibridizációs és immunolokalizációs kísérletekkel bemutattuk, hogy a *Dmoe* mutánsok ivarsejthiányos fenotípusának az oka a helytelen *osk* mRNS és OSK fehérje lokalizáció. A *Dmoe* hatása az *osk* mRNS és OSK fehérje lokalizációjára ivarsejtvonal-függő, ami független a petesejt- follikuláris sejt kommunikációtól. Megmutattuk, hogy a *Dmoe* a mikrotubulusoktól függetlenül hat az *osk* géntermékek lokalizációjára. Bizonyítottuk, hogy a *Dmoe* mutációi a petekamrákban nem járnak sem hibás mikrotubulus-szerveződéssel, sem sejtadhéziós

hibákkal, a petesejtek aktinváza azonban abnormális. Igazoltuk, hogy a *Dmoe* mutánsokban az aktinváz elválzik a sejthártyától. Megmutattuk, hogy a *Dmoe* mutánsokban egy további aktinfüggő folyamat -a bordersejtek mozgása- lelassul.

AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

Genetikai interakción alapuló mutánsizolálás

Az érzékenyített háttér domináns enhanszereinek izolálása

Kifejlesztettünk és sikeresen alkalmaztunk *osk* és *TmII* mutáns, érzékenyített genetikai háttérrel biztosító rendszert egy gyenge poszterior fenotípus enhanszereinek izolálására. Az EMS mutagenézis eredményeként 14 *E(To)* mutációt izoláltunk. A mutagenizált harmadik kromoszómák körülbelül 0,4%-a hordozott *E(To)* mutációt. A komplementációs analízis megmutatta, hogy a legtöbb *E(To)* gént csak egy mutáns alléllal azonosítottuk, és hogy az ismert poszterior gének közül csak hármat izoláltunk. A többtagú komplementációs csoportok és a már ismert poszterior gének hiánya, illetve a megvizsgált mutáns kromoszómák viszonylag alacsony száma azt jelzi, hogy kísérletünk távol volt a genom telítésétől. Ennek alapján igen valószínű, hogy az *osk* és *TmII* mutációkkal érzékenyített rendszer segítségével több mint tizenhárom gént lehet azonosítani. Mivel azonban egy adott érzékenyített háttér segítségével a pleitrop hatású poszterior géneknek csak egy részét lehet azonosítani, a poláris plazma kialakításában részt vevő gének száma még nagyobb lehet.

A tizenhárom *E(To)* mutációval azonosított génből három gén már ismert tagja a poszterior csoportnak: ezek az *osk*, a *vasa* és a *mago* gének. Mivel az érzékenyített háttér tartalmazott egy *osk* mutációt az új *osk* allél hatása egyszerű nem-komplementálás eredménye. A *mago nashi* és a *vasa* allélek izolálása azonban a domináns genetikai interakció alapján történt. A VASA fehérje fizikailag kölcsönhat az OSK fehérjével, izolálása egyértelműen jelzi megközelítésünk hatékonyságát

(BREITWIESER és mtsai. 1996; HAY és mtsai. 1988). A tizennégy *E(To)* mutációból tíz recesszív letális. Ezeket a géneket nem lehetett volna azonosítani egy anyai hatású letális mutációkat izoláló kísérlettel, ami szintén a genetikai interakción alapuló mutánsizolálás hatékonyságát jelzi.

A Rab11 szerepe az *osk* mRNS lokalizációban

Domináns genetikai interakción alapuló mutánsizolálási kísérletben izoláltuk a *Rab11* gén két allélját domináns *E(To)* fenotípusuk alapján. A *Rab11* a vezikulák szállításához szükséges kis GTP-ázokból álló Rab/Ypt fehérjecsald tagja. A fehérjecsald tagjai a vezikulák különböző sejtalkotókhoz történő célbajuttatásában vesznek részt. Emlősökben eddig több mint negyven Rab gént írtak le, melyek minden membránszállítási útvonalban jelen vannak (NUOFFER és BALCH 1994). A *Rab11* részt vesz az endocitotikus membránok reciklizációjában és a Golgi-rendszertől a plazmamembránhoz történő vezikulaszállításban (CASANOVA és mtsai. 1999; CHEN és mtsai. 1998; COX és mtsai. 2000; REN és mtsai. 1998; ULLRICH és mtsai. 1996; WANG és mtsai. 2000). A *PC12* neuroendokrin sejtvonalon jelen van a konstitutív és a regulált szekréciójú vezikulákon, sőt a *Torpedo marmorata* kolinerg sejtjeiben a szinaptikus vezikulákon is megtalálható (URBE és mtsai. 1993). A *Rab11* tehát számos, különféle sejtbiológiai folyamatban is szerepet játszik a vizikulák szállításán.

A *Drosophila Rab11* szerepe az *osk* mRNS lokalizációjában minden bizonnyal indirekt. A Rab11 a petesejt mikrotubulus-hálózatának reorientációját befolyásolja, amit a mikrotubulusok Tau:GFP-vel történő közvetlen megfigyelése és a Kin:β-Gal fehérje ektopikus lokalizációja igazol. Korábbi eredmények azt mutatják, hogy a Kin:β-

Gal azokban a mutánsokban lokalizálódik a petesejt közepén, amelyek a petesejt és a follikuláris sejtek kommunikációját zavarják meg. Mivel más organizmusokban a *Rab11* legjobban jellemzett funkciója az endocitotikus membránok reciklizációja és a Golgi-hálózattól a plazmamembránhoz történő vezikulaszállítás, ésszerűnek tűnt, hogy a *Drosophila Rab11* is a sejtek közötti kommunikáció közvetítésében vesz részt. Két kísérleti eredményünk azonban cáfolja ezt. Először is, az *slbo*¹ enhanszer-csapda expressziójának hiánya a poszterior follikuláris sejtekben azt jelzi, hogy a poszterior follikuláris sejtsors kialakul, tehát a petesejttől kibocsátott gurken-jel eljut a follikuláris sejtekhez. Másodszor, a poszterior póluson nem találtunk mikrotubulus felhalmozódást, ami azt jelzi, hogy a poszterior mikrotubulus organizáló központ - a vad típushoz hasonlóan - felbomlik. Ezzel összhangban soha nem találtunk *bcd* mRNS-t a poszterior póluson, ami azt jelzi, hogy a follikuláris sejtekből kibocsátott jelet a petesejt felfogja. A *Rab11* mutáns petesejtekben megfigyeltünk egy jellegzetes hibás *osk* mRNS lokalizációs fenotípust: az *osk* mRNS egyidejűleg a petesejt poszterior pólusán és a közepén is lokalizálódott. Ez azt jelzi, a *Rab11* mutáns petesejtekben, annak ellenére, hogy a poszterior mikrotubulus organizáló központ felbomlik, a mikrotubulus-hálózat reorientációja nem teljes. A *Rab11* mutáns petesejtekben a reorientáció után az anterior pólusról induló mikrotubulusok nem tökéletesek, csupán a petesejt kérgi részéről eredő mikrotubulusok épek (THEURKAUF és HAZELRIGG 1998). Ezek a mikrotubulusok juttatják az *osk* mRNS-t és a Kin:β-Gal-t a petesejt közepére. A *Rab11* mutáns fenotípusa összességében leginkább a *par1* mutánséra emlékeztet, hiszen a *par1* mutáns petesejtekben is felbomlik a poszterior mikrotubulus organizáló központ, de az *osk* mRNS mégis a petesejt közepén található. A *Rab11* mutáns petesejtekben a hibás *osk* lokalizáció ideiglenes, ektopikus *osk* mRNS lokalizáció csak a petesejt érésének

kilencedik stádiumában figyelhető meg, a tizedik stádiumú petekamrákban az *osk* mRNS lokalizációja vad típusú. Ez arra utal, hogy létezik egy *Rab11*-től független *osk* mRNS lokalizációs útvonal is, ami a tizedik stádiumban a citoplazmaáramlás idején az *osk* mRNS-t a poszterior pólusra juttatja (GLOTZER és mtsai. 1997). Ezek az eredmények azt jelzik, hogy a poszterior mikrotubulus organizáló központ lebomlása önmagában nem elég a mikrotubulusok reorientációjához a peteérés hatodiktól a nyolcadikig tartó stádiumaiban. Valószínűleg egyéb tényezők, mint például a belső membránok is, hozzájárulnak a helyes mikrotubulus-átalakuláshoz. Hasonló ektopikus *osk* mRNS lokalizációt figyeltek meg a *Ter94* mutáns petesejtekben (RUDEN és mtsai. 2000). A *Ter94* gén egy AAA típusú ATP-áz fehérjét kódol, és szintén a belső membránok forgalmában, nevezetesen az endoplazmatikus retikulum vezikuláinak homotipikus fúziójában játszik szerepet. A *Rab11* és a *Ter94* fenotípusa bebizonyította, hogy a belső membránstruktúrák és a sejtváz együttműködése fontos szereppel bír az *osk* mRNS lokalizálásában.

Géncsapda elven alapuló P- elemes mutánsizolálás

Géncsapda-inszerciók izolálása

A géncsapda elven működő P-elemmel mutagenézist hajtottunk végre steril és ivarsejthiányos fenotípusú mutációk izolálása céljából. Mivel az X kromoszómán az autoszómákhoz képest kevesebb mutagenézist végeztek, és az ivarsejthiányos fenotípust az X kromoszómát érintő transzpozonos mutagenézisek során nem vizsgálták, mi ezt a kromoszómát választottuk kísérletünk tárgyául (BOURBON és mtsai. 2002; GANS és mtsai. 1975; PETER és mtsai. 2002; SWAN és mtsai. 2001).

Mivel a mutagenézis során az új P-elem inszerciókat hímekben izoláltuk, és ezekből az egyedi hímekből alapítottunk törzseket, kísérletünk alkalmas volt X kromoszómás nőstényszeril, ivarsejthiányos vagy látható fenotípust okozó mutációk azonosítására. Bár a mutagenézis kis méretű volt és az X kromoszóma telítését meg sem közelítette, a mutáns X kromoszómák körülbelül 2%-a hordozott ivarsejthiányos mutációt. Ez azt jelzi, hogy a módszerünk alkalmas ivarsejthiányos mutációk azonosítására, illetve, hogy az X kromoszómán még számos olyan gén lehet, mely a géncsapda vektorral mutáltatva ivarsejthiányos fenotípust eredményez.

A mutagenézis során izolált új P-elem inszerciók 62%-a az X kromoszómára épült be, míg az autoszómás inszerciók aránya csupán 38% volt. Ez az eredmény rendkívül meglepő, ha tekintetbe vesszük, hogy az X kromoszóma a *Drosophila* genomjának csupán megközelítőleg egy ötödét teszi ki. Az X kromoszómás P-elem beépülések nagyarányú megjelenésének a magyarázata valószínűleg a mutánsizolálás során alkalmazott szelekciós módszerben keresendő. A géncsapda P-elem sajátosságainak megfelelően, a mutánsizolálási kísérletben azokra az új P-elem beépüléseket tartottuk meg, melyekben a mutagén P-elem *miniwhite* markergénje erősen fejeződik ki, így hatására a *w⁻* mutáns egyed sötétpiros szemszínű lesz, míg a világos szemszínt okozó új P-elem inszerciókat nem őriztük meg (lásd. Anyagok és módszerek és ref. (LUKACSOVICH és mtsai. 2001)) Annak a magyarázata, hogy a sötétebb szemszínű állatok között meglepően nagy arányban találunk X kromoszómás P-elem inszerciókat, valószínűleg a *Drosophila* X kromoszómáján működő dóziskompenzációs rendszer jelenlétével köszönhető. Az X kromoszómába beépült „géncsapdázó” P-elem *miniwhite* markergénje a dóziskompenzációs rendszer működése következtében erősen kifejeződik, ami a mutánsizolálás során használt szelekció miatt az X kromoszómás P-

elem beépülések feldúsulásához vezet. Természetesen nem tudjuk kizárni, hogy egy más, a szelekciós eljárástól független, a „génscapdázó” P-elemre jellemző eddig ismeretlen mechanizmus vezetett az X kromoszómás P-elem beépülések feldúsulásához.

A génscapda elven működő P-elemes mutagenézis során ivarsejthiányos fenotípusa alapján izoláltuk, és részletesen jellemeztük a *Drosophila Moesin* gént. Ha a génscapda transzpozon a gén belsejébe épül be, akkor a „csapdába ejtett” génből és a markergénekből fúziós mRNS képződik. A *Dmoe-GFP* és a *miniwhite-Dmoe* fúziós RNS-ből kiinduló RT-PCR alapú klónozás azt bizonyítja, hogy a GT193 inszerció esetében a génscapda vektor valóban „csapdába ejtette” a *Dmoe* gént, azaz a P-elem beépülése a gén belsejébe történt. Bár a GT193 inszerció esetében létezik a GFP-ből és a *Dmoe*-ből álló fúziós mRNS és arról a *Dmoe* kifejeződési mintázatának megfelelően valószínűleg GFP fehérje is képződik (LUKACSOVICH és mtsai. 2001), mégsem tudtunk GFP fluoreszcenciát kimutatni a GT193 inszerciót hordozó nőstények petekamrájában. Ennek az lehet a magyarázata, hogy a fúziós mRNS-ről képződött GFP fehérje szintje túl alacsony, és fluoreszcenciája a detektálhatóság szintje alatt marad.

A *Dmoe* az ERM fehérjecsalád tagja, melyet az emlősökben három közeli rokon fehérje, az *Ezrin*, *Radixin* és a *Moesin* alkot. A család tagjai között az aminosavszerkezet homológia igen magas, körülbelül 75%, és mindegyikük a plazmamembrán alatt a sejtek aktinban gazdag részén lokalizálódik. Mindhárom ERM fehérje C-terminálisán a FERM domén található, mely lehetővé teszi a kapcsolódást számos membránfehérjéhez (CHISHTI és mtsai. 1998). Az ERM fehérjék képesek közvetlenül kötődni a CD44, CD43, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, PKA, E-cadherin, β -catenin fehérjékhez (HISCOX és JIANG 1999; SERRADOR és mtsai. 1997; SERRADOR és

mtsai. 1998; TSUKITA és mtsai. 1994; YONEMURA és mtsai. 1998). Az EBP50 fehérje PDZ doménjén keresztül közvetve számos más fehérjéhez kapcsolódhatnak, mint például NHE3 és a β 2-Adrenerg receptor (BRETSCHER és mtsai. 2000). Az ERM fehérjék N-terminálisán egy aktinkötő domén található. Az ERM fehérjéket doménjeik és szubcelluláris lokalizációjuk alapján az aktinváz és a sejthártya keresztkötéséért felelős fehérjének tartják. Különböző nevük ellenére az *Ezrin*, *Radixin* és a *Moesin* fehérjéket egy alapfehérje három izoformájának tekinthetjük. Ezt erősíti, hogy a *Moesin* null mutáns egér teljesen egészséges, mivel az *Ezrin* és a *Radixin* valószínűleg helyettesítik a hiányzó *Moesint* (DOI és mtsai. 1999). Ezzel összhangban az alacsonyabbrendű állatokban, *Drosophila melanogaster*ben, *Caenorabditis elegans*ban, és *Lytechinus variegatus*ban az ERM családnak csak egy tagja, a *Moesin*, fordul elő (BACHMAN és MCCLAY 1995; MCCARTNEY és FEHON 1996). Az emlősökben meglévő funkcionális redundancia megnehezíti az emlős ERM fehérjék vizsgálatát. Mivel azonban a *Drosophila melanogaster* genomja csak egy ERM fehérjét kódol, kiválóan alkalmas az ERM fehérjék funkcionális vizsgálatára.

A *Dmoe* részt vesz az aktin-sejthártya keresztkötésében

A *Dmoe* mutánsokban az ivarsejtek szubkortikális aktinváza megváltozott, számos helyen benyomult a petesejt belsejébe, a szomszédos dajkasejtek szubkortikális aktinja pedig elvált egymástól. Ez a jelenség kétféleképpen magyarázható. Az első hipotézis szerint az észlelt aktinhibát a petesejt és a follikuláris sejtek közötti sejt-sejt kapcsolat meglazulása okozza: a két sejt elválik egymástól. A cadherin-catenin sejtadhéziós rendszer tagjainak, a *DE-cadherin*nek és a β -catenninek, illetve egy másik sejtadhéziós molekulának, a *filaminnak* mutánsaiban írtak le hasonló aktinhibákat. A *DE-cadherin*

és a *filamin* mutánsokban a dajkasejtek morfológiája abnormális, aktinvázuk elválík egymástól, a *β -catenin* és a *filamin* mutánsokban a szubkortikális aktin benyomul a petesejtbe (LI és mtsai. 1999; ODA és mtsai. 1997; PEIFER és mtsai. 1993). A *Dmoe* részvételét a sejtadhézió kialakításában az a megfigyelés is valószínűsíti, hogy az emlős sejtekben az *Ezrin* asszociált a *E-cadherin*nel és a *β -catenin*el (HISCOX és JIANG 1999). Az ERM fehérjék antiszensz oligonukleotiddal történő szupressziója csökkentette az emlős sejttenyészetekben a sejt-sejt és a sejt-szubsztrát adhéziót, a sejtek elváltak egymástól (HISCOX és JIANG 1999; TAKEUCHI és mtsai. 1994). A második hipotézis szerint a *Dmoe* mutánsokban a szubkortikális aktinváz elválík a sejthártyától. A sejthártya membránfehérjéit a *moesin* az ERM doménjével köti, a szubkortikális aktint pedig az aktinkötő doménjével. Elképzelhető, hogy bár a szomszédos sejtek adhéziója megmarad, a *Dmoe* mutánsokban a sejthártya-aktin kapcsolat megszakad. A *DE-cadherin* és az aktin együttes megjelenítésével bizonyítottuk, hogy az utóbbi hipotézis a helyes. A *Dmoe* mutánsokban a sejtadhézió megmarad, de az ivarsejtek sejthártyája és az aktinváz közötti kapcsolat meggyengülése miatt az aktinváz elválík a sejthártyától. A *Moesin*től eltérően a *filamin* és a *β -catenin* mutánsokban soha nem tapasztalták a poszterior póluson lokalizált molekulák (*osk* és *orb* mRNS-ek, STAU és Dynein fehérjék) hibás lokalizációját (LI és mtsai. 1999; PEIFER és mtsai. 1993). Ez azt mutatja, hogy a *filamin* és a *β -catenin* mutánsokra jellemző sejtadhéziós hibák nem befolyásolják a petesejtben a szimmetriatengelyek kialakulását és a poszterior póluson lokalizált molekulák eloszlását. A *Dmoe* a sejt-sejt adhézió fenntartásától függetlenül játszik szerepet a poszterior póluson lokalizált molekulák lokalizációjában

A *Dmoe* és az *osk* lokalizáció

A *Dmoe* mutánsaiban hibás *osk* mRNS és OSK fehérje eloszlást találtunk. Az *osk* lokalizációja a poszterior póluson két lépésből áll. Az első lépés az *osk* mRNS poszterior pólusra történő szállítása, a második lépés az *osk* mRNS és OSK fehérje lokalizációjának fenntartása a poszterior póluson. Az *osk* mRNS szállítását a poszterior pólusra mikrotubulus-rendszer végzi (BRENDZA és mtsai. 2000; CLARK és mtsai. 1994; GLOTZER és mtsai. 1997). A petesejtben a szubkortikális aktinváz szükséges a normális mikrotubulus- hálózat fenntartásához: CytochlasinD- kezelés és egyes aktinkötő fehérjéket kódoló gének (*capu*, *spire*, *chic*) mutációinak hatására a petesejt mikrotubulusváza nem megfelelő időben alakul át, és korai mikrotubulusfüggő citoplaszmaáramlás indul meg a petesejtben, ami megszakítja a Kin:β-Gal és az *osk* mRNS és az OSK fehérje lokalizációját a poszterior póluson (CLARK és mtsai. 1994). Mivel a DMOE is egy aktinkötő fehérje, felmerül annak lehetősége, hogy mutációi korai citoplaszmaáramlás indukálásával szüntetik meg az *osk* mRNS és az OSK fehérje lokalizációját. Mivel azonban a *Dmoe* mutáns petekamrákban nem tapasztaltunk abnormális mikrotubulus- eloszlást és a Kin:β-Gal is helyesen lokalizálódott, kizárható, hogy a *Dmoe* az aktin-mikrotubulus kapcsolat befolyásolásával okoz hibás *osk* mRNS lokalizációt. Mivel a *Dmoe* mutáns petekamrákban a mikrotubulusváz ép, és a Kin:β-Gal is helyesen lokalizálódik, az *osk* mRNS poszterior pólusra történő szállítása zavartalanul megtörténik.

Az *osk* mRNS poszterior pólusra történő szállításához szükséges a mikrotubulusváz, de a lokalizáció második lépéséhez, a lokalizált RNS poszterior póluson történő rögzítéséhez már nem (CLARK és mtsai. 1994). Ebben a folyamatban valószínűleg az aktinváz játszik fontos szerepet. Az aktinváz mRNS lokalizációban

betöltött szerepét számos rendszerben kimutatták. A *Xenopus* petesejtjében például az aktinváz szükséges a *Vgll* mRNS rögzítéséhez a vegetális póluson (HAVIN és mtsai. 1998). Élesztőben az aktinváz végzi az *aktin* és az *Ash1* mRNS-ek lokalizálását (LONG és mtsai. 1997; SUNDELL és SINGER 1991). A *Drosophila* esetében az aktin szerepe az mRNS- lokalizációban kevésbé világos. Számos megfigyelés valószínűsíti azonban az aktinváz részvételét az *osk* mRNS és OSK fehérje poszterior póluson történő rögzítésében. A petesejt mikrotubulusainak kolhicines destabilizálása megszüntette a Kin:β-Gal lokalizációját a poszterior póluson, míg az *osk* mRNS és fehérje poszterior lokalizációja megmaradt, ami azt sugallja, hogy a mikrotubulusoktól független sejtvázelem - feltehetően az aktinváz - végzi az *osk* mRNS és fehérje poszterior póluson való rögzítését (CLARK és mtsai. 1994). Az aktinváz fontos szerepére utal továbbá az is, hogy a *Drosophila* embriókat az aktint depolimerizáló citochalasinD-val kezelve a poszterior póluson lokalizált mRNS-ek és fehérjék lokalizációja megszűnt (LANTZ és mtsai. 1999). Az aktinkötő fehérjét kódoló *TmII* gén mutációinak vizsgálata szintén azt valószínűsíti, hogy a poszterior póluson lokalizált *osk* mRNS és OSK fehérje megtartását az aktinváz végzi (ERDELYI és mtsai. 1995; TETZLAFF és mtsai. 1996). A *Dmoe* mutáns vizsgálata is ezt támasztja alá. Mivel a *Dmoe* mutáns petekamrákban a mikrotubulusváz ép, és a Kin:β-Gal is helyesen lokalizálódik, az *osk* mRNS poszterior pólusra történő szállítása is zavartalanul megtörténik. A *Dmoe* mutáns petesejtben megfigyelt hibás *osk* mRNS és OSK fehérje lokalizációnak az oka ezért nem az *osk* mRNS mikrotubulusfüggő szállítása szállításában, hanem a mikrotubulusváztól független, aktinfüggő rögzülésben keresendő.

Az *osk* mRNS és OSK fehérje poszterior póluson történő rögzítéséhez szükség van arra, hogy az odaszállított *osk* mRNS transzlálódjon. A lokalizált OSK fehérje

kapcsolódik az *osk* mRNS-hez és pozitív visszacsatolással serkenti saját mRNS-ének rögzítését a poszterior póluson (MARKUSSEN és mtsai. 1995; RONGO és mtsai. 1995). A *Dmoe* mutánsban azonban a lokalizált OSK fehérje poszterior póluson történő rögzítése hibás. Az OSK fehérje-*osk* mRNS komplex nem marad a poszterior póluson, hanem különböző típusú hibás lokalizációkat mutatva elvándorol onnan. Szélsőséges esetben az OSK fehérje egyenletesen eloszlik a petesejtben, vagy lebomlik, így jelenlétét immunfestéssel és Western analízissel nem lehet kimutatni. A *Dmoe* mutánsban az OSK fehérje és *osk* mRNS rögzítésének hibáját a poszterior póluson az aktinváz abnormalitása eredményezi. A *Dmoe* az aktin-sejthártya kapcsolat stabilizálásával lehetővé teszi a poszterior póluson jelen lévő rögzítő komplex helyes működését. Kísérleteink nem alkalmasak annak megválaszolására, hogy az *osk* mRNS vagy az OSK fehérje vagy pedig mindkettő rögzül-e a poszterior póluson. Úgy gondoljuk azonban, hogy az OSK fehérje stabilizálódik a poszterior póluson, és ehhez kapcsolódva rögzül az *osk* mRNS. Az *osk* mRNS transzlációja ugyanis időben egybeesik az *osk* géntermékek a poszterior póluson történő rögzülésével. Az OSK fehérje szerepét jelzi ebben a folyamatban, hogy a misszensz *osk* mutáns petesejtekben az *osk* mRNS delokalizálódik a poszterior pólusról (KIM-HA és mtsai. 1991). A vad típusú petesejtekben az *osk* mRNS eleinte gömbszerű struktúrában van jelen a poszterior pólus közelében, majd a transzláció kezdetével egyidőben félholdszerűen szétoszolva rögzül a kéreg alatt (RONGO és mtsai. 1995). Ez a szétoszlás OSK fehérje hiányában nem játszódik le (DOLLAR és mtsai. 2002). A félholdszerű *osk* mRNS eloszlás kevésbé érzékeny kolhicines kezelésre, ami azt mutatja, hogy az OSK fehérje mikrotubulustól független sejtvázelemhez köti az *osk* mRNS-t (POKRYWKA és STEPHENSON 1995). Az aktinváz szerepét az OSK fehérje poszterior póluson való

rögzítésében az a megfigyelésünk is alátámasztja, hogy a *Dmoe* mutáns petekamrákban az aktin gyakorta kolokalizálódott az OSK fehérjével a vad típustól eltérő helyen is.

Az *osk* géntermékeknek a *Dmoe* mutáns petesejt laterális kérgi részén történő lokalizációja azt jelzi, hogy a laterális aktinváz is képes rögzíteni az OSK fehérjét. Ez a megfigyelés arra utal, hogy az *osk* géntermékek lokalizációjának a helyét a poszterior póluson nem az aktinváz határozza meg. Nagyon valószínű, hogy a poszterior pólus helyét a polarizált mikrotubulusváz határozza meg, azáltal, hogy az *osk* mRNS-t a petesejt meghatározott helyére szállítja. A helyspecifikus transzláció után a poszterior póluson a keletkező OSK fehérje rögzül a közeli aktinvázon, és serkenti saját mRNS-ének további transzlációját.

Összefoglalóan megállapíthatjuk, hogy a *Dmoe* a mikrotubulusváztól és a petesejt-follikuláris sejt kommunikációtól függetlenül hat az *osk* géntermékek lokalizációjára. A *Dmoe* az aktinváz-sejthártya kapcsolat befolyásolásával, az OSK fehérjének a poszterior póluson történő rögzítésén keresztül hat az ivarsejtek kialakítására.

A *Dmoe* és a bordersejtek vándorlása

A *Dmoe* mutáns petekamrákban a bordersejtek normálisan differenciálódnak, mivel a petekamra anterior csúcsán található follikuláris sejtek mindig kifejezik az *slbo*¹ enhanszercsapda markert. A differenciálódott bordersejtek mozgása azonban hibás a *Dmoe* mutánsokban. Ez a megfigyelés összhangban van azzal, hogy az emlős Rat-1 fibroblaszt sejtekben az *Ezrin* a vándorló sejtek vezető élében (leading edge) lokalizálódik, inaktiválása megszünteti a sejthártya kitüremkedéseit és a sejtvándorlást (LAMB és mtsai. 1997). A sejtek mozgásához a sejtek közötti és a sejt-extracelluláris

mátrix közötti interakciók és az aktinváz dinamikus változásai szükségesek. Számos aktinvázat befolyásoló fehérjét kódoló gén ismert (*profilin*, *PKA*, *Rac*, *DE-cadherin*, *β -catenin*), melyek mutációja befolyásolja a bordersejtek vándorlását (LANE és KALDERON 1995; MURPHY és MONTELL 1996; ODA és mtsai. 1997; VERHEYEN és COOLEY 1994). A bordersejtek nagy mennyiségű aktint tartalmaznak, és magas szinten expresszálják a *profilint*, melynek hiánya a sejt vándorlás lelassulását eredményezi. Mivel a *profilin* a G-aktin polimerizációjához szükséges, a vándorlás hibájának oka a *profilin* mutánsokban a bordersejtek aktinvázának dinamikus változásának hibája lehet (VERHEYEN és COOLEY 1994). A *Moesin*nek nem ismeretes szerepe az aktin polimerizációjában, a bordersejtekre gyakorolt hatását valószínűleg nem ezen a szinten fejt ki. Egy további, a bordersejtek vándorlását befolyásoló gén a *PKA*, mely minden bizonnyal indirekt módon hat a bordersejtek vándorlására. A *PKA* mutánsokban a dajkasejtek fúzionálnak, így a bordersejtek nem tudnak zavartalanul áthaladni a dajkasejtek között (LANE és KALDERON 1995). A *Dmoe* mutánsban nem vizsgáltuk a dajkasejtek fúzióját, így nem zárhatjuk ki, hogy a *Dmoe* a *PKA*-val azonos módon akadályozza a sejt vándorlást. A bordersejtek vándorlását befolyásoló további gén, a *Rac*, egy kis GTP-ázt kódol, és mutációja a *Moesin*hez hasonlóan hibás bordersejtvándorlást okoz. A *Rac* mutánsban a bordersejtek nem képeznek a dajkasejtek közé behatoló aktin gazdag filopódiumokat (MURPHY és MONTELL 1996). A filopódiumok kialakulását nem vizsgáltuk a *Dmoe* mutánsokban, így a *Dmoe* közvetlen szerepe ebben a folyamatban nem zárható ki. A cadherin-catenin sejtadhéziós komplex is szükséges a dajkasejtek vándorlásához, hiszen a *DECadherin* és a *β -catenin* mutációi is hibás bordersejtvándorlást okoznak, ami a sejt-sejt kapcsolatok megszűnésének és dinamikus újraalakulásának hibájára utal (ODA és

mtsai. 1997). Az emlős sejtekben egy ERM fehérje, az *ezrin*, asszociált az *E-cadherin* és a β -*catenin* (HISCOX és JIANG 1999). Nem valószínű azonban, hogy a *Dmoe* a cadherin-catenin komplexen keresztül, a sejtadhézió befolyásolásával hat a dajkasejtek vándorlására, mivel az aktinváz és a *DE-cadherin* együttes festésével bizonyítottuk, hogy a *Dmoe* mutánsokban a sejtek adhéziója megmarad.

A *Dmoe* és a gyűrűcsatornák

A *Dmoe* mutáns petesejtek citoplazmájában találtunk a sejthártyáról leszakadt gyűrűcsatornákat. Immunolokalizációs kísérletünk azonban megmutatta, hogy a *Dmoe* nem komponense a gyűrűcsatornának, és a gyűrűcsatorna közelében a sejthártyán sem mutat felhalmozódást. A *Dmoe*-hez hasonló gyűrűcsatorna-fenotípust tapasztaltak *Cdc42*, *RhoL*, β -*catenin*, *DE-cadherin*, *PKA* mutánsokban, melyek szintén nem tagjai a gyűrűcsatornának (LANE és KALDERON 1995; MURPHY és MONTELL 1996; ODA és mtsai. 1997). Ezekről a génekről azt gondolják, hogy nem a gyűrűcsatornák felépítéséhez szükségesek, hanem a gyűrűcsatornák sejtmembránhoz történő rögzítéséhez nélkülözhetetlenek. Ezekhez a génekhez hasonlóan valószínűleg a *Dmoe* sem a gyűrűcsatornák szerkezetének kialakításában vesz részt, hanem minden bizonnyal a kortikális aktinváz és a sejthártya integritásának és stabilitásának szabályozásában játszik szerepet, mutációja közvetve vezet a gyűrűcsatorna-sejthártya kapcsolat megszakadásához.

A *Moesin* és a *Rab11* lehetséges kapcsolata

Bár a *Rab11*-nek és a *Dmoe*-nek az *osk* mRNS és az OSK fehérje lokalizációban betöltött szerepe valószínűleg különböző, elképzelhető, hogy a két fehérje közvetve kölcsönhatásba lép egymással. Élesztő kettős hibrid rendszer, koimmunoprecipitáció és GTP overlay segítségével kimutatták, hogy a humán *Rab11* fehérje fizikai kölcsönhatásba lép egy ERM- szerű domént tartalmazó fehérjével, az *Eferin*nel (HALES és mtsai. 2001; PREKERIS és mtsai. 2001). A humán *Rab11* normál patkány vese (NRK), MDCK és HeLa sejt vonalakban kolokalizálódott az *Eferin*nel. A humán *Spire* és a *Rab11* gének vizsgálata jelzi, hogy az aktinváz és a belső membránok között szoros funkcionális kapcsolat van. A humán *Rab11* fehérje fizikailag kölcsönhatásba lép, illetve az NIH 3T3 sejt vonalban kolokalizálódik a humán *Spire* fehérjével (KERKHOF és mtsai. 2001). A *Spire* egy aktinkötő fehérje, ami kapcsolódik az intracelluláris membránokhoz. A *Drosophila*-ban *Spire* és a *Rab11* a poszterior gének csoportjába tartozik; mindkettőjük mutációi az *osk* mRNS hibás lokalizációját okozzák. Számos további megfigyelés bizonyítja, hogy az ERM fehérjék fontos szerepet játszanak a membránok dinamikájában és az endocitotikus membránforgalomban (összefoglalva: ld. (BRETSCHER 1999) (BRETSCHER és mtsai. 2000; LOUVET-VALLEE 2000). A β 2-adrenerg receptor reciklizációjához szükség van az ERM fehérjék jelenlétére (CAO és mtsai. 1999). A gyomor parietális sejtjeiben a H^+ -ATP-áz reciklizációja során az *Ezrin* foszforillálódik (AGNEW és mtsai. 1999). Az ERM fehérjék szerepét sejteti az endocitotikus membránforgalomban, hogy az *Ezrin* és a *Moesin* asszociált az endoszómával (HARDER és mtsai. 1997). A *Drosophila* *Rab11*-

nek az *osk* mRNS szállításán kívül -a *Moesin*hez hasonlóan- szerepet tulajdonítanak az OSK fehérje rögzítésében is (DOLLAR és mtsai. 2002).

A *Rab11* és a *Dmoe* a petesejt rendkívül sajátos kérgi régiójának a szervezésében vesznek részt. A sejtnak ebben a speciális régiójában a mikrotubulusok, mikrofilamentumok és a membránok szoros funkcionális kapcsolatban állnak. Valószínű, hogy az egyik komponens hibás működése a másik két rendszer működését is megzavarja. Bizonyos, hogy a jövőben a *Dmoe* és a *Rab11* gének további vizsgálata értékes információkkal fog szolgálni ennek a sejtrésznek a működéséről.

SUMMARY

The anterior-posterior and dorsal-ventral axes of the *Drosophila* embryo originate from the inherent asymmetry of the egg chamber and depend on the localisation of specific mRNAs within the developing oocyte. Abdomen and germ cell development of *Drosophila melanogaster* embryo requires proper localisation of *oskar* (*osk*) mRNA to the posterior pole of the developing oocyte. *osk* mRNA localisation depends on complex cell biological events like cell-cell communication, dynamic rearrangement of the microtubule network, and function of the actin cytoskeleton of the oocyte. Transport of the *osk* mRNA is mediated by microtubules, while anchoring of the *osk* gene products at the posterior pole of the oocyte has been suggested to be microfilament dependent. To investigate the cellular mechanisms involved, we performed two mutagenesis screens: an interaction type and a loss-of-function type of screen. In my thesis I describe the mutagenic screens and the detailed analysis of two new members of the group of genes involved *osk* mRNA localisation (posterior group).

Interaction type of genetic screen

To identify new members of the posterior group of genes, we performed a mutagenic screen, based on dominant genetic interaction. We found two sensitive genetic backgrounds by which it was possible to monitor the effect of dominant enhancers on both the abdomen- and the germ cell-less phenotypes. We isolated dominant enhancers (*E(To)*) of the intermediate abdomenless phenotype of the *TmII^{es9} ca/st osk⁵⁴ TmII^{el4}* genetic background. Newly induced mutations were first screened in

this sensitised background. In this screen we isolated 14 dominant enhancers of the *osk*- and *TmII*-based abdomenless phenotype. The second sensitised background was composed of *TmII^{eg9}* and *TmII^{eg20}* alleles and exhibited a leaky germ cell-less phenotype. We introduced *E(To)* mutations, identified in the first sensitive background, into the *TmII^{eg9}/TmII^{eg20}* background and measured their effect on the germ cell-less phenotype. Seven *E(To)* mutations enhanced the germ cell-less phenotype of the second sensitive mutant background as well, confirming that these mutations are indeed members of the posterior gene hierarchy. Complementation analysis revealed the allelism with three previously known genes, involved in *osk* mRNA localisation demonstrating the usefulness of our approach. Furthermore, we have isolated two lethal alleles of the *Drosophila* homologue of the *Rab11* gene by their dominant *E(To)* phenotypes. We performed the detailed phenotypic analysis of *Drosophila Rab11*, a gene encoding small monomeric GTP-ase involved in the regulation of the cytoplasmic membrane trafficking. Using semi-sterile *Rab11* combinations we observed a weak germ cell-less phenotype, which is characteristic for mutations of many genes involved in abdomen and germ cell development. Given the fact that two *Rab11* alleles were identified as modifiers of an *osk*-deficient genetic background, we examined the *osk* mRNA distribution in the viable *Rab11* heteroallelic combinations. At stage 9 of oogenesis, transient abnormal *osk* mRNA localisation patterns were detected in the *Rab11* mutant oocytes. The strongest observed abnormality was a scattered *osk* mRNA staining pattern in the oocyte, which mostly concentrated near to the posterior pole. In addition, *osk* mRNA mislocalized to an ectopic site in the center of the oocyte. We also observed an intermediate phenotype in the mutant egg chambers in which the normal posterior and the mislocalized central *osk* stainings were simultaneously present. The

effect of *Rab11* mutations on *osk* localisation was found to be germ line dependent, and they did not affect either localisation of *grk* and *bcd* mRNAs or communication events between the oocyte and the follicle cells. By direct visualisation of the microtubules we showed that *Rab11* is involved in the regulation of the polarized microtubule cytoskeleton of the developing oocyte: instead of the wild type anterior-to-posterior microtubule polarity we observed mainly cortical microtubule accumulation in the *Rab11* mutant oocytes. We demonstrated that the ectopic *osk* mRNA localisation in the *Rab11* mutants is a consequence of an abnormally polarized oocyte microtubule cytoskeleton. Our results indicate that the internal membranous structures play an important role in the microtubule organization of the *Drosophila* oocyte, and thus in *oskar* RNA localisation.

Loss-of function screen with „gene trap” P-element

By a P-element mediated loss-of-function screen on the X chromosome we isolated two mutations with germ cell-less phenotype. Molecular cloning of one of them revealed that the P-element inserted into the *Drosophila Moesin* (*Dmoe*) gene, the only *Drosophila* member of the ERM family. Subsequent complementation analyses using a collection of P element induced mutations, revealed the existence of five additional insertional alleles of *Dmoe*. In addition to the germ cell-less phenotype, detailed phenotypic analysis of the *Dmoe* allele combinations revealed several additional pleiotropic *Dmoe* phenotypes such as lethality, female sterility, border cell migration defects and imperfect eye and wing development. In my PhD thesis I focus mainly on the maternal effect germ cell-less phenotype. Western blot analysis of *Dmoe*

mutant ovaries revealed a reduction in the DMOE protein level and precise excisions of P elements from *Dmoe* alleles restored wild type germ cell development. These results demonstrate that the maternal effect germ cell-less phenotype is a direct consequence of P-element insertions in the *Dmoe* gene. Since ERM proteins have been suggested to function as crosslinkers between the actin network and the cell membrane, we examined the organisation of actin filaments in *Dmoe* oocytes. Instead of a tight, wild type subcortical localisation, in *Dmoe* mutants the actin network seemed to be detached from the cortex, and often intruded into the cytoplasm of the oocyte either at the posterior pole or at more lateral regions. By simultaneous visualisation of actin and *DE-cadherin*, a transmembrane protein, we showed that at actin intrusion sites, *DE-cadherin* distribution was normal. These results demonstrate that in *Dmoe* mutants, the gross morphology of the oocyte cell membrane is normal, and that the observed actin abnormality is due to detachment of subcortical actin from the cell membrane. We concluded therefore, that one of the functions of *Dmoe* in the developing oocytes is to crosslink the subcortical actin network and the cell membrane.

Since the embryonic germ cell development depends on the anterior to posterior transport and subsequent anchoring of *osk* mRNA, we examined the distribution of *osk* mRNA in *Dmoe* oocytes. Instead of the characteristic, wild type posterior localisation we found several different types of abnormal *osk* mRNA distribution in the mutants. Most frequently, the mislocalised *osk* mRNA appeared in a scattered pattern near the posterior pole. Mislocalisation of *osk* mRNA to the central regions of oocytes was also observed. In some stage 10 oocytes, ectopic *osk* mRNA was found to be localised tightly to the lateral cell cortex. Consistently, another pole plasm component, the STAUFEN (STAU) protein, which always colocalises with *osk* mRNA, showed a

identical distribution to that of *osk* mRNA in the mutant oocytes. Similar *osk* mRNA mislocalisation has been observed when signalling between the oocyte and the surrounding somatic follicle cells is disrupted. In *Dmoe* mutants, however, the oocyte-follicle cell communication was unaffected, as indicated by the correct expression of polar follicle cell specific enhancer trap markers, and by the correct localisation of *bcd* and *grk* mRNAs and the oocyte nucleus. In the *Dmoe* oocytes, furthermore, a normal arrangement of the microtubule network was found both by immunostaining and by direct *in vivo* visualisation of the microtubules using Tubulin:GFP or Tau:GFP. By a simultaneous visualisation of STAU protein and microtubule plus ends we showed that STAU mislocalisation is not a consequence of an abnormal microtubule network. In *Dmoe* mutant oocytes, the plus ends of the microtubules normally point to the posterior pole, as demonstrated by the correct localisation of Kin:β-Gal. In contrast, however, STAU is mislocalised, suggesting that the mislocalisation of *osk* mRNA is not a consequence of abnormal transport; rather, it appears to be caused by abnormal anchoring. In order to further investigate the role of DMOE in *osk* regulation we examined the distribution of OSK protein in *Dmoe* mutants. In the *Dmoe* oocytes mislocalised OSK protein was found to be similarly mislocalised as *osk* mRNA was. By simultaneous visualisation of actin and OSK protein in mutant oocytes, we detected a close correlation between OSK and subcortical actin localisation. In the rare cases when detachment of actin from the cell membrane occurred at the posterior pole, we observed that OSK protein was colocalised with the ectopic actin network. This ectopic colocalisation of the actin network and OSK protein in *Dmoe* mutants is the first demonstration that actin anchors OSK to the subcortical area of the oocyte. Additionally, we observed a novel *osk* mRNA and protein delocalisation phenotype in

Dmoe mutants where *osk* products were tightly localised to lateral segments of the subcortical actin. This result indicates that the lateral actin network is also able to anchor *osk* mRNA and protein. Furthermore, this observation suggests that the focus of the posterior localisation of *osk* products in the wild type is defined by factors other than actin, most probably by the initial posterior transport of *osk* mRNA to this region. We propose that after its site-specific translation, OSK is bound to the nearby actin region where it is tightly anchored, and subsequently promotes localisation of its own mRNA and a host of other posterior specific factors.

In my PhD thesis I describe the performance of two mutagenesis screens, by which we isolated mutants of several novel posterior group genes. I present the detailed analysis of two posterior genes, *Rab11* and *Dmoe*. This PhD thesis shows that *Rab11* affect the posterior transport of *osk* mRNA, while *Dmoe* is required for actin organisation of the oocyte and anchoring of the *osk* gene products at the posterior pole.

IRODALOMJEGYZÉK

- ADAMS, M. D.,S. E. CELNIKER,R. A. HOLT,C. A. EVANS,J. D. GOCAYNE et al ,
2000 The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**: 2185-2195.
- AGNEW, B. J.,J. G. DUMAN,C. L. WATSON,D. E. COLING and J. G. FORTE, 1999
Cytological transformations associated with parietal cell stimulation: critical steps in the activation cascade. *J. Cell Sci.* **112 (Pt 16)**: 2639-2646.
- BACHMAN, E. S. and D. R. MCCLAY, 1995 Characterization of moesin in the sea urchin *Lytechinus variegatus*: redistribution to the plasma membrane following fertilization is inhibited by cytochalasin B. *J. Cell Sci.* **108 (Pt 1)**: 161-171.
- BASHIRULLAH, A.,R. L. COOPERSTOCK and H. D. LIPSHITZ, 1998 RNA localization in development. *Annu. Rev. Biochem.* **67**: 335-394.
- BERLETH, T.,M. BURRIG, G. THOMA,D. BOPP,S. RICHSTEIN et al , 1988 The role of localization of bicoid RNA in organizing the anterior pattern of the *Drosophila* embryo. *EMBO J.* **7**: 1749-1756.
- BOHRMANN, J. and K. BIBER, 1994 Cytoskeleton-dependent transport of cytoplasmic particles in previtellogenic to mid-vitellogenic ovarian follicles of *Drosophila*: time-lapse analysis using video-enhanced contrast microscopy. *J. Cell Sci.* **107 (Pt 4)**: 849-858.
- BOSWELL, R. E.,M. E. PROUT and J. C. STEICHEN, 1991 Mutations in a newly identified *Drosophila melanogaster* gene, *mago nashi*, disrupt germ cell formation and result in the formation of mirror-image symmetrical double abdomen embryos [published erratum appears in *Development* 1991 Dec;113(4):preceding Table of Contents]. *Development* **113**: 373-384.
- BOURBON, H. M.,G. GONZY-TREBOUL,F. PERONNET,M. F. ALIN,C. ARDOUREL et al , 2002 A P-insertion screen identifying novel X-linked essential genes in *Drosophila*. *Mech. Dev.* **110**: 71-83.
- BREITWIESER, W.,F. H. MARKUSSEN,H. HORSTMANN and A. EPHRUSSI, 1996 Oskar protein interaction with Vasa represents an essential step in polar granule assembly. *Genes Dev.* **10**: 2179-2188.

- BRENDZA, R. P., L. R. SERBUS, J. B. DUFFY and W. M. SAXTON, 2000 A function for kinesin I in the posterior transport of oskar mRNA and Staufen protein. *Science* **289**: 2120-2122.
- BRETSCHER, A., 1999 Regulation of cortical structure by the ezrin-radixin-moesin protein family. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**: 109-116.
- BRETSCHER, A., D. CHAMBERS, R. NGUYEN and D. RECZEK, 2000 ERM-Merlin and EBP50 protein families in plasma membrane organization and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**: 113-143.
- CAO, T. T., H. W. DEACON, D. RECZEK, A. BRETSCHER and M. VON ZASTROW, 1999 A kinase-regulated PDZ-domain interaction controls endocytic sorting of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* **401**: 286-290.
- CASANOVA, J. E., X. WANG, R. KUMAR, S. G. BHARTUR, J. NAVARRE et al , 1999 Association of Rab25 and Rab11a with the apical recycling system of polarized Madin-Darby canine kidney cells. *Mol. Biol. Cell* **10**: 47-61.
- CHARTRAND, P., R. H. SINGER and R. M. LONG, 2001 RNP localization and transport in yeast. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **17**: 297-310.
- CHEN, W., Y. FENG, D. CHEN and A. WANDINGER-NESS, 1998 Rab11 is required for trans-golgi network-to-plasma membrane transport and a preferential target for GDP dissociation inhibitor. *Mol. Biol. Cell* **9**: 3241-3257.
- CHISHTI, A. H., A. C. KIM, S. M. MARFATIA, M. LUTCHMAN, M. HANSPAL et al , 1998 The FERM domain: a unique module involved in the linkage of cytoplasmic proteins to the membrane. *Trends Biochem. Sci.* **23**: 281-282.
- CHOU, T. B. and N. PERRIMON, 1996 The autosomal FLP-DFS technique for generating germline mosaics in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **144**: 1673-1679.
- CLARK, I., E. GINIGER, H. RUOHOLA-BAKER, L. Y. JAN and Y. N. JAN, 1994 Transient posterior localization of a kinesin fusion protein reflects anteroposterior polarity of the *Drosophila* oocyte. *Curr. Biol.* **4**: 289-300.
- CLARK, I. E., L. Y. JAN and Y. N. JAN, 1997 Reciprocal localization of Nod and kinesin fusion proteins indicates microtubule polarity in the *Drosophila* oocyte, epithelium, neuron and muscle. *Development* **124**: 461-470.

- COX, D., D. J. LEE, B. M. DALE, J. CALAFAT and S. GREENBERG, 2000 A Rab11-containing rapidly recycling compartment in macrophages that promotes phagocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**: 680-685.
- DENG, W. M. and H. RUOHOLA-BAKER, 2000 Laminin A is required for follicle cell-oocyte signaling that leads to establishment of the anterior-posterior axis in *Drosophila*. *Curr. Biol.* **10**: 683-686.
- DOI, Y., M. ITOH, S. YONEMURA, S. ISHIHARA, H. TAKANO et al, 1999 Normal development of mice and unimpaired cell adhesion/cell motility/actin-based cytoskeleton without compensatory up-regulation of ezrin or radixin in moesin gene knockout. *J. Biol. Chem.* **274**: 2315-2321.
- DOLLAR, G., E. STRUCKHOFF, J. MICHAUD and R. S. COHEN, 2002 Rab11 polarization of the *Drosophila* oocyte: a novel link between membrane trafficking, microtubule organization, and oskar mRNA localization and translation. *Development* **129**: 517-526.
- EISENBERG, M., K. GATHY, T. VINCENT and J. RAWLS, 1990 Molecular cloning of the UMP synthase gene rudimentary-like from *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genet.* **222**: 1-8.
- EMMONS, S., H. PHAN, J. CALLEY, W. CHEN, B. JAMES et al, 1995 Cappuccino, a *Drosophila* maternal effect gene required for polarity of the egg and embryo, is related to the vertebrate limb deformity locus. *Genes Dev.* **9**: 2482-2494.
- EPHRUSSI, A., L. K. DICKINSON and R. LEHMANN, 1991 Oskar organizes the germ plasm and directs localization of the posterior determinant nanos. *Cell* **66**: 37-50.
- EPHRUSSI, A. and R. LEHMANN, 1992 Induction of germ cell formation by oskar. *Nature* **358**: 387-392.
- ERDELYI, M., A. M. MICHON, A. GUICHET, J. B. GLOTZER and A. EPHRUSSI, 1995 Requirement for *Drosophila* cytoplasmic tropomyosin in oskar mRNA localization [see comments]. *Nature* **377**: 524-527.
- GANS, M., C. AUDIT and M. MASSON, 1975 Isolation and characterization of sex-linked female-sterile mutants in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **81**: 683-704.

- GLOTZER, J. B., R. SAFFRICH, M. GLOTZER and A. EPHRUSSI, 1997 Cytoplasmic flows localize injected oskar RNA in *Drosophila* oocytes. *Curr. Biol.* **7**: 326-337.
- GONZALEZ-REYES, A., H. ELLIOTT and D. ST JOHNSTON, 1995 Polarization of both major body axes in *Drosophila* by gurken-torpedo signalling. *Nature* **375**: 654-658.
- GONZALEZ-REYES, A. and D. ST JOHNSTON, 1994 Role of oocyte position in establishment of anterior-posterior polarity in *Drosophila*. *Science* **266**: 639-642.
- GROISMAN, I., Y. S. HUANG, R. MENDEZ, Q. CAO, W. THEURKAUF et al , 2000 CPEB, maskin, and cyclin B1 mRNA at the mitotic apparatus: implications for local translational control of cell division. *Cell* **103**: 435-447.
- HALES, C. M., R. GRINER, K. C. HOBDY-HENDERSON, M. C. DORN, D. HARDY et al , 2001 Identification and characterization of a family of Rab11-interacting proteins. *J. Biol. Chem.* **276**: 39067-39075.
- HARDER, T., R. KELLNER, R. G. PARTON and J. GRUENBERG, 1997 Specific release of membrane-bound annexin II and cortical cytoskeletal elements by sequestration of membrane cholesterol. *Mol. Biol. Cell* **8**: 533-545.
- HAVIN, L., A. GIT, Z. ELISHA, F. OBERMAN, K. YANIV et al , 1998 RNA-binding protein conserved in both microtubule- and microfilament- based RNA localization. *Genes Dev.* **12**: 1593-1598.
- HAY, B., L. Y. JAN and Y. N. JAN, 1988 A protein component of *Drosophila* polar granules is encoded by vasa and has extensive sequence similarity to ATP-dependent helicases. *Cell* **55**: 577-587.
- HISCOX, S. and W. G. JIANG, 1999 Ezrin regulates cell-cell and cell-matrix adhesion, a possible role with E-cadherin/beta-catenin. *J. Cell Sci.* **112 Pt 18**: 3081-3090.
- HOROWITZ, H. and C. A. BERG, 1995 Aberrant splicing and transcription termination caused by P element insertion into the intron of a *Drosophila* gene. *Genetics* **139**: 327-335.

- IIDA, T. and S. KOBAYASHI, 1998 Essential role of mitochondrially encoded large rRNA for germ-line formation in *Drosophila* embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**: 11274-11278.
- JANKOVICS, F., R. SINKA and M. ERDELYI, 2001 An interaction type of genetic screen reveals a role of the Rab11 gene in oskar mRNA localization in the developing *Drosophila melanogaster* oocyte. *Genetics* **158**: 1177-1188.
- JANSEN, R. P., 2001 mRNA localization: message on the move. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**: 247-256.
- JOHNSTONE, O. and P. LASKO, 2001 Translational regulation and RNA localization in *Drosophila* oocytes and embryos. *Annu. Rev. Genet.* **35**: 365-406.
- JONGENS, T. A., B. HAY, L. Y. JAN and Y. N. JAN, 1992 The germ cell-less gene product: a posteriorly localized component necessary for germ cell development in *Drosophila*. *Cell* **70**: 569-584.
- KERKHOFF, E., J. C. SIMPSON, C. B. LEBERFINGER, I. M. OTTO, T. DOERKS et al , 2001 The Spir actin organizers are involved in vesicle transport processes. *Curr. Biol.* **11**: 1963-1968.
- KIEBLER, M. A. and L. DESGROSEILLERS, 2000 Molecular insights into mRNA transport and local translation in the mammalian nervous system. *Neuron* **25**: 19-28.
- KIM-HA, J., J. L. SMITH and P. M. MACDONALD, 1991 oskar mRNA is localized to the posterior pole of the *Drosophila* oocyte. *Cell* **66**: 23-35.
- KLOC, M., S. BILINSKI, A. P. CHAN, L. H. ALLEN, N. R. ZEARFOSS et al , 2001 RNA localization and germ cell determination in *Xenopus*. *Int. Rev. Cytol.* **203**: 63-91.
- LAMB, R. F., B. W. OZANNE, C. ROY, L. MCGARRY, C. STIPP et al , 1997 Essential functions of ezrin in maintenance of cell shape and lamellipodial extension in normal and transformed fibroblasts. *Curr. Biol.* **7**: 682-688.
- LANE, M. E. and D. KALDERON, 1994 RNA localization along the anteroposterior axis of the *Drosophila* oocyte requires PKA-mediated signal transduction to direct normal microtubule organization. *Genes Dev.* **8**: 2986-2995.

- LANE, M. E. and D. KALDERON, 1995 Localization and functions of protein kinase A during *Drosophila* oogenesis. *Mech. Dev.* **49**: 191-200.
- LANTZ, V. A., S. E. CLEMENS and K. G. MILLER, 1999 The actin cytoskeleton is required for maintenance of posterior pole plasm components in the *Drosophila* embryo. *Mech. Dev.* **85**: 111-122.
- LAWRENCE, J. B. and R. H. SINGER, 1986 Intracellular localization of messenger RNAs for cytoskeletal proteins. *Cell* **45**: 407-415.
- LEWIS, E. B. and B. BACHER, 1968 Method for feeding ethyl methane sulphonate (E.M.S.) to *Drosophila* males. *Drosophila Inform. Serv* **43**: 193.
- LI, M., M. MCGRAIL, M. SERR and T. S. HAYS, 1994 *Drosophila* cytoplasmic dynein, a microtubule motor that is asymmetrically localized in the oocyte. *J. Cell Biol.* **126**: 1475-1494.
- LI, M. G., M. SERR, K. EDWARDS, S. LUDMANN, D. YAMAMOTO et al , 1999 Filamin is required for ring canal assembly and actin organization during *Drosophila* oogenesis. *J. Cell Biol.* **146**: 1061-1074.
- LI, P., X. YANG, M. WASSER, Y. CAI and W. CHIA, 1997 Inscuteable and Staufén mediate asymmetric localization and segregation of prospero RNA during *Drosophila* neuroblast cell divisions. *Cell* **90**: 437-447.
- LINDSLEY, D. L., ZIMM G. G., 1992. The genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press, Inc., San Diego, California.
- LIPSHITZ, H. D. and C. A. SMIBERT, 2000 Mechanisms of RNA localization and translational regulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **10**: 476-488.
- LONG, R. M., R. H. SINGER, X. MENG, I. GONZALEZ, K. NASMYTH et al , 1997 Mating type switching in yeast controlled by asymmetric localization of *ASH1* mRNA. *Science* **277**: 383-387.
- LOUVET-VALLEE, S., 2000 ERM proteins: from cellular architecture to cell signaling. *Biol. Cell* **92**: 305-316.
- LUKACSOVICH, T., Z. ASZTALOS, W. AWANO, K. BABA, S. KONDO et al , 2001 Dual-Tagging Gene Trap of Novel Genes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **157**: 727-742.

- MACDOUGALL, N., Y. LAD, G. S. WILKIE, H. FRANCIS-LANG, W. SULLIVAN et al , 2001 Merlin, the Drosophila homologue of neurofibromatosis-2, is specifically required in posterior follicle cells for axis formation in the oocyte. *Development* **128**: 665-673.
- MAHOWALD, A. P., 2001 Assembly of the Drosophila germ plasm. *Int. Rev. Cytol.* **203**: 187-213.
- MANSEAU, L., J. CALLEY and H. PHAN, 1996 Profilin is required for posterior patterning of the Drosophila oocyte. *Development* **122**: 2109-2116.
- MARKUSSEN, F. H., A. M. MICHON, W. BREITWIESER and A. EPHRUSSI, 1995 Translational control of oskar generates short OSK, the isoform that induces pole plasma assembly. *Development* **121**: 3723-3732.
- MCCARTNEY, B. M. and R. G. FEHON, 1996 Distinct cellular and subcellular patterns of expression imply distinct functions for the Drosophila homologues of moesin and the neurofibromatosis 2 tumor suppressor, merlin. *J. Cell Biol.* **133**: 843-852.
- MICKLEM, D. R., R. DASGUPTA, H. ELLIOTT, F. GERGELY, C. DAVIDSON et al , 1997 The mago nashi gene is required for the polarisation of the oocyte and the formation of perpendicular axes in Drosophila. *Curr. Biol.* **7**: 468-478.
- MURPHY, A. M. and D. J. MONTELL, 1996 Cell type-specific roles for Cdc42, Rac, and RhoL in Drosophila oogenesis. *J. Cell Biol.* **133**: 617-630.
- NAKAMURA, A., R. AMIKURA, M. MUKAI, S. KOBAYASHI and P. F. LASKO, 1996 Requirement for a noncoding RNA in Drosophila polar granules for germ cell establishment. *Science* **274**: 2075-2079.
- NEUMAN-SILBERBERG, F. S. and T. SCHUPBACH, 1993 The Drosophila dorsoventral patterning gene gurken produces a dorsally localized RNA and encodes a TGF alpha-like protein. *Cell* **75**: 165-174.
- NUOFFER, C. and W. E. BALCH, 1994 GTPases: multifunctional molecular switches regulating vesicular traffic. *Annu. Rev. Biochem.* **63**: 949-990.
- ODA, H., T. UEMURA and M. TAKEICHI, 1997 Phenotypic analysis of null mutants for DE-cadherin and Armadillo in Drosophila ovaries reveals distinct aspects of

- their functions in cell adhesion and cytoskeletal organization. *Genes Cells* **2**: 29-40.
- PALACIOS, I. M. and D. S. JOHNSTON, 2001 Getting the message across: the intracellular localization of mRNAs in higher eukaryotes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **17**: 569-614.
- PEIFER, M.,S. ORSULIC,D. SWEETON and E. WIESCHAUS, 1993 A role for the *Drosophila* segment polarity gene armadillo in cell adhesion and cytoskeletal integrity during oogenesis. *Development* **118**: 1191-1207.
- PERRIMON, N.,A. LANJUIN,C. ARNOLD and E. NOLL, 1996 Zygotic lethal mutations with maternal effect phenotypes in *Drosophila melanogaster*. II. Loci on the second and third chromosomes identified by P-element-induced mutations. *Genetics* **144**: 1681-1692.
- PETER, A.,P. SCHOTTLER,M. WERNER,N. BEINERT,G. DOWE et al , 2002 Mapping and identification of essential gene functions on the X chromosome of *Drosophila*. *EMBO Rep.* **3**: 34-38.
- POKRYWKA, N. J. and E. C. STEPHENSON, 1995 Microtubules are a general component of mRNA localization systems in *Drosophila* oocytes. *Dev. Biol.* **167**: 363-370.
- PREKERIS, R.,J. M. DAVIES and R. H. SCHELLER, 2001 Identification of a novel Rab11/25 binding domain present in Eferin and Rip proteins. *J. Biol. Chem.* **276**: 38966-38970.
- RAY, R. P. and T. SCHUPBACH, 1996 Intercellular signaling and the polarization of body axes during *Drosophila* oogenesis. *Genes Dev.* **10**: 1711-1723.
- REN, M.,G. XU,J. ZENG,C. LEMOS-CHIARANDINI,M. ADESNIK et al , 1998 Hydrolysis of GTP on rab11 is required for the direct delivery of transferrin from the pericentriolar recycling compartment to the cell surface but not from sorting endosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**: 6187-6192.
- ROBINSON, D. N. and L. COOLEY, 1997 Genetic analysis of the actin cytoskeleton in the *Drosophila* ovary. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**: 147-170.
- ROEGIERS, F. and Y. N. JAN, 2000 Staufen: a common component of mRNA transport in oocytes and neurons? *Trends Cell Biol.* **10**: 220-224.

- RONGO, C., E. R. GAVIS and R. LEHMANN, 1995 Localization of oskar RNA regulates oskar translation and requires Oskar protein. *Development* **121**: 2737-2746.
- ROTH, S., F. S. NEUMAN-SILBERBERG, G. BARCELO and T. SCHUPBACH, 1995 cornichon and the EGF receptor signaling process are necessary for both anterior-posterior and dorsal-ventral pattern formation in *Drosophila*. *Cell* **81**: 967-978.
- RUDEN, D. M., V. SOLLARS, X. WANG, D. MORI, M. ALTERMAN et al , 2000 Membrane fusion proteins are required for oskar mRNA localization in the *Drosophila* egg chamber. *Dev. Biol.* **218**: 314-325.
- RUOHOLA, H., K. A. BREMER, D. BAKER, J. R. SWEDLOW, L. Y. JAN et al , 1991 Role of neurogenic genes in establishment of follicle cell fate and oocyte polarity during oogenesis in *Drosophila*. *Cell* **66**: 433-449.
- SERRADOR, J. M., J. L. ALONSO-LEBRERO, M. A. DEL POZO, H. FURTHMAYR, R. SCHWARTZ-ALBIEZ et al , 1997 Moesin interacts with the cytoplasmic region of intercellular adhesion molecule-3 and is redistributed to the uropod of T lymphocytes during cell polarization. *J. Cell Biol.* **138**: 1409-1423.
- SERRADOR, J. M., M. NIETO, J. L. ALONSO-LEBRERO, M. A. DEL POZO, J. CALVO et al , 1998 CD43 interacts with moesin and ezrin and regulates its redistribution to the uropods of T lymphocytes at the cell-cell contacts. *Blood* **91**: 4632-4644.
- SEYDOUX, G. and A. FIRE, 1994 Soma-germline asymmetry in the distributions of embryonic RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Development* **120**: 2823-2834.
- SEYDOUX, G. and T. SCHEDL, 2001 The germline in *C. elegans*: origins, proliferation, and silencing. *Int. Rev. Cytol.* **203**: 139-185.
- SHULMAN, J. M., R. BENTON and D. ST JOHNSTON, 2000 The *Drosophila* homolog of *C. elegans* PAR-1 organizes the oocyte cytoskeleton and directs oskar mRNA localization to the posterior pole. *Cell* **101**: 377-388.
- SIPOS, L., J. MIHALY, F. KARCH, P. SCHEDL, J. GAUSZ et al , 1998 Transvection in the *Drosophila* Abd-B domain: extensive upstream sequences are involved in

- anchoring distant cis-regulatory regions to the promoter. *Genetics* **149**: 1031-1050.
- SPRADLING, A., 1993. Developmental Genetics of Oogenesis. In: Bate, M., Martinez Arias, A. (Eds.), *The Development of Drosophila melanogaster*. CSHL Press, Cold Spring Harbor, pp. 1-70.
- ST JOHNSTON, D. and C. NUSSLEIN-VOLHARD, 1992 The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo. *Cell* **68**: 201-219.
- SUNDELL, C. L. and R. H. SINGER, 1991 Requirement of microfilaments in sorting of actin messenger RNA. *Science* **253**: 1275-1277.
- SWAN, A., S. HIJAL, A. HILFIKER and B. SUTER, 2001 Identification of new X-chromosomal genes required for *Drosophila* oogenesis and novel roles for *fs(1)Yb*, *brainiac* and *dunce*. *Genome Res.* **11**: 67-77.
- TAKEUCHI, K., N. SATO, H. KASAHARA, N. FUNAYAMA, A. NAGAFUCHI et al , 1994 Perturbation of cell adhesion and microvilli formation by antisense oligonucleotides to ERM family members. *J. Cell Biol.* **125**: 1371-1384.
- TETZLAFF, M. T., H. JACKLE and M. J. PANKRATZ, 1996 Lack of *Drosophila* cytoskeletal tropomyosin affects head morphogenesis and the accumulation of *oskar* mRNA required for germ cell formation. *EMBO J.* **15**: 1247-1254.
- THEURKAUF, W. E., 1994 Premature microtubule-dependent cytoplasmic streaming in *cappuccino* and *spire* mutant oocytes. *Science* **265**: 2093-2096.
- THEURKAUF, W. E. and T. I. HAZELRIGG, 1998 In vivo analyses of cytoplasmic transport and cytoskeletal organization during *Drosophila* oogenesis: characterization of a multi-step anterior localization pathway. *Development* **125**: 3655-3666.
- THEURKAUF, W. E., S. SMILEY, M. L. WONG and B. M. ALBERTS, 1992 Reorganization of the cytoskeleton during *Drosophila* oogenesis: implications for axis specification and intercellular transport. *Development* **115**: 923-936.
- TOMANCAK, P., F. PIANO, V. RIECHMANN, K. C. GUNSALUS, K. J. KEMPHUES et al , 2000 A *Drosophila melanogaster* homologue of *Caenorhabditis elegans* *par-1* acts at an early step in embryonic-axis formation. *Nat. Cell Biol.* **2**: 458-460.

- TSUKITA, S., K. OISHI, N. SATO, J. SAGARA, A. KAWAI et al, 1994 ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. *J. Cell Biol.* **126**: 391-401.
- TSUKITA, S. and S. YONEMURA, 1999 Cortical actin organization: lessons from ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins. *J. Biol. Chem.* **274**: 34507-34510.
- ULLRICH, O., S. REINSCH, S. URBE, M. ZERIAL and R. G. PARTON, 1996 Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *J. Cell Biol.* **135**: 913-924.
- URBE, S., L. A. HUBER, M. ZERIAL, S. A. TOOZE and R. G. PARTON, 1993 Rab11, a small GTPase associated with both constitutive and regulated secretory pathways in PC12 cells. *FEBS Lett.* **334**: 175-182.
- VAN EEDEN, F. J., I. M. PALACIOS, M. PETRONCZKI, M. J. WESTON and D. ST JOHNSTON, 2001 Barentsz is essential for the posterior localization of oskar mRNA and colocalizes with it to the posterior pole. *J. Cell Biol.* **154**: 511-523.
- VERHEYEN, E. M. and L. COOLEY, 1994 Profilin mutations disrupt multiple actin-dependent processes during *Drosophila* development. *Development* **120**: 717-728.
- WANG, C. and R. LEHMANN, 1991 Nanos is the localized posterior determinant in *Drosophila* [published erratum appears in *Cell* 1992 Mar 20;68(6):1177]. *Cell* **66**: 637-647.
- WANG, X., R. KUMAR, J. NAVARRE, J. E. CASANOVA and J. R. GOLDENRING, 2000 Regulation of vesicle trafficking in MDCK cells by Rab11a and Rab25. *J. Biol. Chem.*
- WICKHAM, L., T. DUCHAINE, M. LUO, I. R. NABI and L. DESGROSEILLERS, 1999 Mammalian stau1 is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol. Cell Biol.* **19**: 2220-2230.
- XU, T., L. A. CARON, R. G. FEHON and S. ARTAVANIS-TSAKONAS, 1992 The involvement of the Notch locus in *Drosophila* oogenesis. *Development* **115**: 913-922.

YONEMURA, S.,M. HIRAO,Y. DOI,N. TAKAHASHI,T. KONDO et al , 1998

Ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43, and ICAM-2. *J. Cell Biol.* **140**: 885-895.

ZHOU, Y. and M. L. KING, 1996 Localization of Xcat-2 RNA, a putative germ plasm component, to the mitochondrial cloud in *Xenopus* stage I oocytes. *Development* **122**: 2947-2953.

SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

JANKOVICS, F., SINKA R. és ERDÉLYI M.: 2001 An interaction type of genetic screen reveals a role of the *Rab11* gene in *osk* mRNA localization in the developing *Drosophila melanogaster* oocyte. **Genetics** **158**: 1177-1188

SINKA, R., JANKOVICS F., SOMOGYI K., SZLANKA T., LUKÁCSOVICH T. és ERDÉLYI M., 2002 *piorot*, a new regulatory gene of the *Drosophila oskar* act at the level of the short Oskar isoform. **Development** közlésre elfogadva

JANKOVICS F., SINKA R., LUKÁCSOVICH T. és ERDÉLYI M., 2002 Dmoesin crosslinks actin and cell membrane in *Drosophila* oocyte and is required for OSKAR anchoring. **Current Biology** közlésre benyújtva